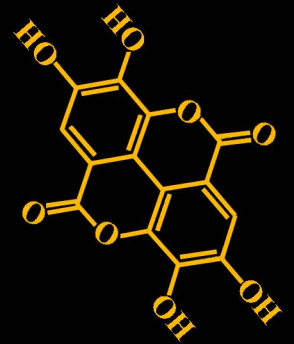


**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΕΝΔΡΟΚΟΜΙΑΣ**

**Διδακτορική Διατριβή**

**Μοριακός Χαρακτηρισμός Γενετικού Υλικού Καρυδιάς και Παράγοντες που Επηρεάζουν την Ποιότητα των Καρπών της**



**Χριστόπουλος Μιλτιάδης**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΕΝΔΡΟΚΟΜΙΑΣ**

**Διδακτορική Διατριβή**

**Μοριακός Χαρακτηρισμός Γενετικού Υλικού Καρυδιάς και  
Παράγοντες που Επηρεάζουν την Ποιότητα των Καρπών της**

**Χριστόπουλος Μιλτιάδης**

**ΑΘΗΝΑ 2012**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΕΝΔΡΟΚΟΜΙΑΣ**

**Διδακτορική Διατριβή**

**Μοριακός Χαρακτηρισμός Γενετικού Υλικού Καρυδιάς και  
Παράγοντες που Επηρεάζουν την Ποιότητα των Καρπών της**

**Χριστόπουλος Μιλτιάδης**

**Επταμελής εξεταστική επιτροπή:**

Ελένη Τσαντίλη, Αν. Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα

Μιχαήλ Κωμαίτης, Καθηγητής, Μέλος (και Τριμελούς Επιτροπής)

Πηνελόπη Μπεμπέλη, Καθηγήτρια, Μέλος (και Τριμελούς Επιτροπής)

Σταύρος Βέμμος, Αν. Καθηγητής, Μέλος

Κορτέσσα Δημάσση-Θεριού, Καθηγήτρια, Μέλος

Χαρολντ Πάσσαμ, Καθηγητής, Μέλος

Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής, Μέλος

## Αντί Προλόγου

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δενδροκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ελένης Τσαντίλη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ. Τσαντίλη που με καθοδήγησε και επέβλεψε για πολλά χρόνια από την πτυχιακή μου μελέτη μέχρι και την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής και με εμπιστεύτηκε αναθέτοντάς μου ένα σύγχρονο και ενδιαφέρον θέμα. Το συνεχές ενδιαφέρον της και οι συστάσεις της για την επίλυση προβλημάτων, συνέβαλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της διατριβής.

Για την εκπόνηση και ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής ήταν καθοριστική η συμβολή της Καθηγήτριας Πηνελόπης Μπεμπέλη την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την καθοδήγηση και επίβλεψη κατά την εκπόνηση του μέρους της διατριβής που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βελτίωσης Φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Μιχαήλ Κωμαΐτη για το συνεχές ενδιαφέρον του για την πρόοδο της εργασίας μου, καθώς επίσης και για την πρόθυμη φιλοξενία στο εργαστήριο Χημείας Τροφίμων κατά την διενέργεια των προκαταρκτικών πειραμάτων με τη χρήση της HPLC.

Επίσης ευχαριστώ όλα τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για το χρόνο που διέθεσαν για την ανάγνωση της μελέτης μου.

Θερμά ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στον Διευθυντή του Σταθμού Γεωργικής Έρευνας Βαρδατών Δρ. Δήμο Ρούσκα για την παροχή του φυτικού υλικού ώστε να πραγματοποιηθεί η παρούσα μελέτη.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Jerzy Zon από το Πανεπιστήμιο της Βαρσοβίας (Πολωνία) που είχε την ευγενική καλοσύνη να μου παραχωρήσει τον παραμποδιστή δράσης της PAL.

Ευχαριστώ θερμά τον Διευθυντή του εργαστηρίου Γεωργικών Κατασκευών Καθηγητή Γεώργιο Μαυρογιαννόπουλο για την παροχή του οργάνου μέτρησης της φωτοσύνθεσης, καθώς και τον φίλο Δρ. Ιωάννη Λυκοσκούφη για την επίδειξη του οργάνου.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Χάρολντ Πάσσαμ για την παροχή του οργάνου μέτρησης της συνεκτικότητας καθώς και το προσωπικό του εργαστηρίου Λαχανοκομίας για τη φιλοξενία του.

Ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Παναγιώτη Τερζόπουλο για την βοήθειά του κατά την εκμάθηση των μοριακών τεχνικών, την κ. Κωνσταντίνα Ασπρακά για την τεχνική της βοήθεια

κατά τη χρήση του φασματογράφου μαζών (HPLC-MS), καθώς και τη Δρ. Βασιλική Παπαγεωργίου για την τεχνική της βοήθεια κατά τη χρήση της HPLC στο εργαστήριο Χημείας Τροφίμων.

Ευχαριστώ θερμά το συνάδελφο γεωπόνο Δημήτρη Σαλλή για την ευγενική παροχή του κτήματός του στην Καρυά Κορινθίας για την διενέργεια ενός πειραματικού μέρους της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Δενδροκομίας, προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές για το ενδιαφέρον τους και τη φιλική τους διάθεση, που έκαναν ιδιαίτερα ευχάριστη την εργασία μου στο εργαστήριο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη φίλη και Υποψήφια Διδάκτορα Μίνα Καυκαλέτου για την πολύχρονη συνεργασία μας, τις συζητήσεις, την ανταλλαγή απόψεων και υλικών που ήταν πάντα ουσιαστικές. Επίσης ευχαριστώ θερμά τους συναδέλφους γεωπόνους και φίλους Λεωνίδα Τζαμιγιώζη, Λεωνίδα Φιλτικάκη, Δρ. Βασίλη Στουρνάρα, Κώστα Κωνσταντινίδη, Θοδωρή Δαμβακάρη, Νικολέτα Δεναζά, Χαρά Τακιδέλη, Ευαγγελία Πετρή για τη βοήθειά τους κατά το σπάσιμο των χιλιάδων καρυδιών που απαιτήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας διατριβής. Ευχαριστώ το φίλο ηλεκτρονικό Στέφανο Φιλτικάκη για την πρόθυμη και ανιδιοτελή επισκευή οργάνων όποτε χρειάστηκε. Τέλος ευχαριστώ ιδιαίτερα τη συνάδελφο γεωπόνο Γεωργία Δημητρίου για την πολυδιάστατη βοήθειά της εντός και εκτός εργαστηρίου.

Συντομογραφίες.....	8
Ευρετήριο Πινάκων.....	10
Ευρετήριο Γραφημάτων.....	14
Ευρετήριο Σχημάτων.....	18
Ευρετήριο Εικόνων.....	19
Γενική περίληψη.....	21
Abstract.....	24
<b>ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>27</b>
<i>I. Εξάπλωση και καλλιέργεια της καρδιάς παγκοσμίως.....</i>	<i>29</i>
<i>II. Διατροφική αξία των καρπών της καρδιάς.....</i>	<i>29</i>
<i>III. Αντικειμενικός σκοπός της παρούσας διατριβής.....</i>	<i>30</i>
<i>IV. Βιβλιογραφία.....</i>	<i>32</i>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....</b>	<b>35</b>
<i>Μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας και των γενετικών σχέσεων ποικιλιών και ελληνικών τοπικών πληθυσμών καρδιάς (<i>Juglans regia L.</i>) με τη χρήση ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) δεικτών</i>	
<i>Περίληψη.....</i>	<i>37</i>
<b>1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>39</b>
1.1.1. Καταγωγή, εξάπλωση και καλλιέργεια της καρδιάς.....	39
1.1.2. Γενετική παραλλακτικότητα καρδιάς.....	39
1.1.3. Μοριακοί δείκτες στη μελέτη γονότυπων καρδιάς.....	40
1.1.4. Σκοπός κεφαλαίου.....	42
<b>1.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>43</b>
1.2.1. Φυτικό υλικό.....	43
1.2.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	45
1.2.3. Απομόνωση γενωμικού DNA.....	47
1.2.4. Ενίσχυση DNA, επιλογή εκκινητών και διαχωρισμός προϊόντων.....	48
1.2.5. Στατιστική ανάλυση δεδομένων.....	49
<b>1.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>51</b>
1.3.1. Μοριακοί δείκτες ISSR στην ανάλυση του γενετικού υλικού της καρδιάς.....	51

1.3.2. Γενετικές ομοιότητες και ομαδοποίηση γονότυπων καρυδιάς.....	54
1.3.3. Ανάλυση της μοριακής διασποράς για τις ελληνικές επιλογές καρυδιάς.....	58
1.3.4. Συσχέτιση μεταξύ μοριακών και μορφολογικών δεδομένων του γενετικού υλικού της καρυδιάς.....	59
<b>1.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>60</b>
1.4.1. Μοριακοί δείκτες ISSR στην ανάλυση του γενετικού υλικού της καρυδιάς.....	60
1.4.2. Γενετικές ομοιότητες και ομαδοποίηση γονότυπων καρυδιάς.....	61
1.4.3. Γενετική παραλλακτικότητα και γεωγραφικό μοτίβο ελληνικών επιλογών καρυδιάς.....	62
1.4.4. Συσχέτιση μεταξύ μοριακών και μορφολογικών δεδομένων του γενετικού υλικού της καρυδιάς.....	64
1.4.5. Συμπεράσματα.....	64
<b>1.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>65</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....</b>	<b>70</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....</b>	<b>71</b>
<i>Επίδραση των συνθηκών συντήρησης, επί των ποιοτικών χαρακτηριστικών των αποξηραμένων καρπών τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς</i>	
<i>Περίληψη.....</i>	<i>73</i>
<b>2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>75</b>
2.1.1. Γενική σύσταση καρυδιού.....	75
2.1.2. Φαινολικά συστατικά και αντιοξειδωτική ικανότητα.....	76
2.1.2.1. Γενικά περί αντιοξειδωτικών και των ιδιοτήτων τους.....	76
2.1.2.2. Φαινολικά και αντιοξειδωτική ικανότητα καρυδιών.....	76
2.1.3. Σύσταση καρυδέλαιου.....	78
2.1.4. Ποιοτικά χαρακτηριστικά καρυδιών σύμφωνα την αντίληψη του καταναλωτή.....	80
2.1.5. Αγρονομικά χαρακτηριστικά εξεταζόμενων ποικιλιών.....	81
2.1.5.1. Chandler.....	81
2.1.5.2. Franquette.....	81
2.1.5.3. Hartley.....	82
2.1.5.4. Ιόλη.....	82
2.1.6. Μετά-συλλεκτική μεταχείριση καρυδιών.....	82
2.1.7. Μεταβολές ποιοτικών χαρακτηριστικών κατά τη συντήρηση των καρυδιών.....	83
2.1.8. Σκοπός κεφαλαίου.....	84

<b>2.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>85</b>
2.2.1. Φυτικό υλικό.....	85
2.2.2. Αποφλοίωση-αποξήρανση-διαλογή καρπών.....	85
2.2.3. Πειραματικό σχέδιο και χαρακτηριστικά των καρπών που αξιολογήθηκαν.....	85
2.2.4. Συσκευασία-Συντήρηση καρπών.....	86
2.2.5. Μετρήσεις ποιοτικών-καρπολογικών χαρακτηριστικών.....	87
2.2.5.1. Υγρασία και ελαιοπεριεκτικότητα σπέρματος.....	87
2.2.5.2. Χρώμα σπέρματος.....	87
2.2.6. Εκτίμηση αντιοξειδωτικών ουσιών καρπών.....	88
2.2.6.1. Εκχύλιση αντιοξειδωτικών ουσιών.....	88
2.2.6.2. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών (TP).....	89
2.2.6.3. Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC).....	89
2.2.7. Εκτίμηση χαρακτηριστικών του καρυδέλαιου των καρπών.....	91
2.2.7.1. Εξαγωγή καρυδέλαιου.....	91
2.2.7.2. Προσδιορισμός ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA).....	91
2.2.7.3. Προσδιορισμός βαθμού υπεροξειδίων (PV).....	91
2.2.7.4. Προσδιορισμός του προφίλ των λιπαρών οξέων.....	92
2.2.8. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	93
<b>2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>95</b>
2.3.1. Συγκέντρωση του O <sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα της συσκευασίας κατά τη συντήρηση.....	95
2.3.2. Περιεκτικότητα υγρασίας και ελαιοπεριεκτικότητα των σπερμάτων.....	95
2.3.3. Χρώμα των σπερμάτων μετά την αποξήρανση και κατά τη συντήρηση.....	96
2.3.4. Ολικά φαινολικά και αντιοξειδωτική ικανότητα.....	101
2.3.4.1. Ολικά φαινολικά.....	101
2.3.4.2. Αντιοξειδωτική ικανότητα.....	103
2.3.5. Χαρακτηριστικά καρυδέλαιου.....	106
2.3.5.1. Ελεύθερα λιπαρά οξέα και βαθμός υπεροξειδίων.....	106
2.3.5.2. Λιπαρά οξέα.....	109
2.3.6. Σχέσεις μεταξύ των χαρακτηριστικών.....	118
2.3.6.1. Αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά και χρώμα.....	118
2.3.6.2. Χαρακτηριστικά καρυδέλαιου.....	120
2.3.6.3. Αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά καρπού και χαρακτηριστικά καρυδέλαιου.....	123
<b>2.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>127</b>
2.4.1. Περιεκτικότητα υγρασίας των σπερμάτων.....	127
2.4.2. Ολικά φαινολικά και αντιοξειδωτική ικανότητα.....	127
2.4.3. Χρώμα σπέρματος.....	130



2.4.4. Ελεύθερα λιπαρά οξέα και βαθμός υπεροξειδίων.....	132
2.4.5. Λιπαρά οξέα.....	135
2.4.6. Συμπεράσματα.....	137
<b>2.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>138</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Π.....</b>	<b>148</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....</b>	<b>149</b>
<i>Μετά-συλλεκτική συμπεριφορά ενδοκαρπίων και σπερμάτων νωπών καρυδιών - Επίδραση της χαμηλής θερμοκρασίας επί των φαινολικών συστατικών</i>	
<i>Περίληψη.....</i>	<b>151</b>
<b>3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>153</b>
3.1.1. Νωπά ή φρέσκα ή μη-αποξηραμένα καρύδια.....	153
3.1.2. Συντήρηση νωπών καρπών Ακροδρύων.....	153
3.1.3. Φυτικές φαινολικές ενώσεις.....	154
3.1.4. Βιοσύνθεση φαινολικών στα φυτά.....	155
3.1.5. Ευρέως διαδεδομένα φαινολικά-φύση και κατανομή των φαινολικών στην καρυδιά.....	157
3.1.5.1. Υδροξυβενζοϊκά οξέα.....	158
3.1.5.2. Κινναμικά οξέα.....	160
3.1.5.3. Κινόνες.....	161
3.1.5.4. Φλαβονοειδή.....	162
3.1.5.5. Ταννίνες.....	164
3.1.6. Επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών επί των φαινολικών συστατικών.....	166
3.1.7. Σκοπός κεφαλαίου.....	167
<b>3.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>168</b>
3.2.1. Φυτικό υλικό.....	168
3.2.2. Αποφλοιώση-διαλογή καρπών.....	168
3.2.3. Πειραματικό σχέδιο και χαρακτηριστικά των καρπών που αξιολογήθηκαν.....	168
3.2.4. Πειραματικές επεμβάσεις και συντήρηση.....	169
3.2.5. Μετρήσεις ποιοτικών-καρπολογικών χαρακτηριστικών.....	173
3.2.5.1. Μέγεθος, σκληρότητα κελύφους, ποσοστό σπέρματος.....	173
3.2.5.2. Υγρασία και ελαιοπεριεκτικότητα σπέρματος.....	173
3.2.5.3. Χρώμα σπέρματος.....	173
3.2.6. Αναπνοή και έκλυση αιθυλενίου.....	174
3.2.7. Εκτίμηση αντιοξειδωτικών ουσιών των καρπών.....	174

3.2.7.1. Εκχύλιση αντιοξειδωτικών ουσιών.....	174
3.2.7.2. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών.....	174
3.2.7.3. Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.....	175
3.2.7.4. Μέτρηση φαινολικών συστατικών με τη χρήση HPLC.....	175
3.2.8. Μετρήσεις ενζυμικών παραμέτρων.....	176
3.2.8.1. Εκχύλιση και προσδιορισμός ενεργότητας της PAL.....	176
3.2.8.3. Εκχύλιση προσδιορισμός ενεργοτήτων των PPO και POD.....	177
3.2.8.4. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών στο εκχύλισμα των ενζύμων... 178	
3.2.9. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	179
<b>3.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>181</b>
3.3.1. Χαρακτηριστικά ολόκληρων ενδοκαρπίων καρδιάς.....	181
3.3.2. Απώλεια βάρους, αναπνοή, παραγωγή αιθυλενίου και χρώμα σπέρματος.....	184
3.3.2.1. Απώλεια βάρους.....	184
3.3.2.2. Αναπνοή και έκλυση αιθυλενίου σπέρματος.....	184
3.3.2.3. Χρώμα σπέρματος.....	185
3.3.3. Ολικά φαινολικά (TP) και ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) σπέρματος.....	187
3.3.4. Αποξήρανση καρυδιών έπειτα από έκθεση νωπών καρπών σε χαμηλή θερμοκρασία.....	190
3.3.5. Αλλαγές αντιοξειδωτικών σε σχέση με τη θερμοκρασία συντήρησης.....	192
3.3.5.1. Πείραμα Γ.....	192
3.3.5.2. Πείραμα Δ.....	
Ολικά και μεμονωμένα φαινολικά.....	197
Ενεργότητες ενζύμων.....	205
3.3.4. Σχέσεις μεταξύ των χαρακτηριστικών.....	212
3.3.4.1. Πείραμα Α.....	212
3.3.4.2. Πείραμα Γ.....	213
<b>3.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>215</b>
3.4.1. Χαρακτηριστικά ολόκληρων ενδοκαρπίων καρδιάς (OE) κατά τη συντήρηση.....	215
3.4.2. Θρεπτική αξία κατά τη συντήρηση.....	216
3.4.3. Σύγκριση νωπών και αποξηραμένων σπερμάτων καρυδιών.....	218
3.4.4. Μεταβολές φαινολικών σε σχέση με τη θερμοκρασία συντήρησης.....	219
3.4.5. Συμπεράσματα.....	225
<b>3.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>227</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ.....</b>	<b>235</b>

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....</b>	<b>245</b>
<i>Επίδραση της χαραγής επί των ποιοτικών και καρπολογικών χαρακτηριστικών των καρυδιών</i>	
<i>Περίληψη.....</i>	<b>247</b>
<b>4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>249</b>
4.1.1. Ωρίμανση-συγκομιδή καρυδιών.....	249
4.1.2. Φωτοσύνθεση και διαλυτά σάκχαρα των φύλλων της καρυδιάς.....	250
4.1.3. Χαραγή-δακτυλίωση.....	251
3.1.4. Σκοπός κεφαλαίου.....	251
<b>4.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>253</b>
4.2.1. Φυτικό υλικό.....	253
4.2.2. Πειραματικό σχέδιο και χαρακτηριστικά των καρπών που αξιολογήθηκαν.....	253
4.2.3. Αποφλοίωση-διαλογή καρπών.....	254
4.2.4. Μετρήσεις ποιοτικών-καρπολογικών χαρακτηριστικών.....	254
4.2.4.1. Βάρος καρπών.....	254
4.2.4.2. Υγρασία και ελαιοπεριεκτικότητα σπέρματος.....	254
4.2.4.3. Χρώμα σπέρματος.....	254
4.2.5. Εκτίμηση αντιοξειδωτικών ουσιών των καρπών.....	255
4.2.5.1. Εκχύλιση αντιοξειδωτικών ουσιών.....	255
4.2.5.2. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών.....	255
4.2.5.3. Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.....	255
4.2.6. Προσδιορισμός διαλυτών σακχάρων.....	255
4.2.6.1. Εκχύλιση διαλυτών σακχάρων.....	255
4.2.6.2. Χρωματογραφική ανάλυση διαλυτών σακχάρων.....	256
4.2.7. Εκτίμηση χαρακτηριστικών του καρυδέλαιου των καρπών.....	256
4.2.7.1. Εξαγωγή καρυδέλαιου.....	256
4.2.7.2. Προσδιορισμός ελεύθερων λιπαρών οξέων.....	256
4.2.7.3. Προσδιορισμός βαθμού υπεροξειδίων.....	256
4.2.7.4. Προσδιορισμός του προφίλ των λιπαρών οξέων.....	256
4.2.7. Μετρήσεις χαρακτηριστικών φύλλων.....	256
4.2.7.1. Μέτρηση ρυθμού αφομοίωσης CO <sub>2</sub> (Φωτοσύνθεση).....	256
4.2.7.2. Προσδιορισμός διαλυτών σακχάρων.....	257
3.2.9. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	257
<b>4.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>258</b>
4.3.1. Ποσοστό ωριμότητας καρπών και καρπολογικά χαρακτηριστικά.....	258

4.3.2. Χρώμα σπέρματος.....	260
4.3.3. Ολικά φαινολικά και ολική αντιοξειδωτική ικανότητα σπέρματος.....	260
4.3.4. Διαλυτά σάκχαρα σπέρματος.....	262
4.3.5. Χαρακτηριστικά καρυδέλαιου.....	263
4.3.5.1. Ελεύθερα λιπαρά οξέα και βαθμός υπεροξειδίων.....	263
4.3.5.2. Προφίλ λιπαρών οξέων.....	263
3.3.6. Ρυθμός αφομοίωσης CO <sub>2</sub> και διαλυτά σάκχαρα φύλλων.....	265
<b>4.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>267</b>
4.4.1. Ποσοστό ωριμότητας καρπών, καρπολογικά χαρακτηριστικά.....	267
4.4.2. Ποιοτικά χαρακτηριστικά σπερμάτων με βάση την αντίληψη του καταναλωτή.....	267
4.4.3. Ποιοτικά χαρακτηριστικά σπερμάτων με βάση τη θρεπτική αξία.....	268
4.4.4. Ρυθμός αφομοίωσης CO <sub>2</sub> φύλλων και διαλυτά σάκχαρα φύλλων και σπερμάτων.....	269
4.4.5. Συμπεράσματα.....	270
<b>4.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>272</b>

## Συντομογραφίες

---

<b>AAE</b>	Ισοδύναμα ασκορβικού οξέως, ascorbic acid equivalents
<b>ABTS</b>	2,2-Azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid)
<b>ACT</b>	Ακτινομυσίνη D, actinomycin D
<b>A<sub>CO2</sub></b>	Ρυθμός αφομοίωσης CO <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> assimilation rate
<b>AFLP</b>	Πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων, Amplified fragment length polymorphism
<b>AIP</b>	2-aminoindane-2-phosphonic acid
<b>AMOVA</b>	Ανάλυση της μοριακής διασποράς, analysis of molecular variance
<b>ANOVA</b>	Αναλύση της διασποράς, analysis of variance
<b>AR</b>	Αραχιδικό οξύ, arachidic acid
<b>C*</b>	Κορεσμός, saturation
<b>CE</b>	Ισοδύναμα κατεχίνης, catechin equivalents
<b>CHX</b>	Κυκλοεξιμίδη, cycloheximide
<b>COR</b>	Cordycepin
<b>DDW</b>	Διπλά απεσταγμένο νερό, double distilled water
<b>DHB</b>	2,4-διδυδροξυβενζοϊκό οξύ, 2,4-dihydroxybenzoic acid
<b>DPPH</b>	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity
<b>DW</b>	Ξηρό βάρος, dry weight
<b>EL</b>	Ελλαγικό οξύ, ellagic acid
<b>FA</b>	Λιπαρά οξέα, fatty acids
<b>FAME</b>	Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων, fatty acid methylester
<b>FFA</b>	Ελεύθερα λιπαρά οξέα, free fatty acids
<b>FRAP</b>	Ferric reducing antioxidant power
<b>GA</b>	Γαλλικό οξύ, gallic acid
<b>GAE</b>	Ισοδύναμα γαλλικού οξέως, gallic acid equivalents
<b>GO</b>	Γονδοϊκό οξύ, gondoic acid
<b>HB</b>	4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 4-hydroxybenzoic acid
<b>h°</b>	Γωνία hue, hue angle
<b>HSD</b>	Έντιμη σημαντική διαφορά, honest significant difference
<b>ISSR</b>	Ενδο-μικροδορυφορικές επαναλήψεις, inter simple sequence repeats
<b>L*</b>	Φωτεινότητα, lightness
<b>LL</b>	Λινελαϊκό οξύ, linoleic acid
<b>LN</b>	Λίνολενικό οξύ, linolenic acid
<b>MeOH</b>	Μεθανολη, methanol
<b>MI</b>	Ένδειξη μοριακών δεικτών, marker Index
<b>MUFA</b>	Μόνο-ακόρεστα λιπαρά οξέα, mono-saturated fatty acids
<b>OE</b>	Ολόκληρο ενδοκάρπιο καρυδιάς
<b>MY</b>	Μυριστικό οξύ, myristic acid

<b>OL</b>	Ελαϊκό οξύ, oleic acid
<b>ORAC</b>	Oxygen radical absorbance capacity
<b>PA</b>	Παλμιτικό οξύ, palmitic acid
<b>PAL</b>	Φαινυλαλανίνη αμμωνία-λυάση, phenylalanine ammonia-lyase
<b>PC</b>	Πρωτοκατεχικό οξύ, protocatechuic acid
<b>PCA</b>	Ανάλυση κυρίων συνιστωσών, principal component analysis
<b>PCE</b>	Αιθυλεστέρας του πρωτοκατεχικού οξέως, protocatechuic acid ethyl ester
<b>PhP</b>	Μονοπάτι των φαινυλπροπανοειδών, phenylpropanoid pathway
<b>PIC</b>	Περιεχόμενο πληροφορίας πολυμορφισμού, polymorphic information content
<b>PO</b>	Παλμιτελαϊκό οξύ, palmitoleic acid
<b>POD</b>	Υπεροξειδάση, peroxidase
<b>PPO</b>	Πολυφαινολοξειδάση, polyphenol oxidase
<b>PUFA</b>	Πολύ-ακόρεστα λιπαρά οξέα, poly-unsaturated fatty acids
<b>PV</b>	Βαθμός υπεροξειδίων, peroxide value
<b>RAPD</b>	Τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA, random amplified polymorphic DNA
<b>Rp</b>	Αναλυτική δύναμη εκκινητών, resolving power
<b>SAMPL</b>	Selective amplification microsatellite polymorphic loci
<b>SFA</b>	Κορεσμένα λιπαρά οξέα, saturated fatty acids
<b>ShP</b>	Μονοπάτι του σικιμικού οξέως, shikimic acid pathway
<b>SS</b>	Διαλυτά σάκχαρα, soluble sugars
<b>ST</b>	Στεαρικό οξύ, stearic acid
<b>SY</b>	Συρινγικό οξύ, syringic acid
<b>TA</b>	Trolox acid
<b>TAC</b>	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, total antioxidant capacity
<b>TAE</b>	Ισοδύναμα trolox acid, trolox acid equivalents
<b>TEAC</b>	Trolox equivalent antioxidant capacity
<b>TFA</b>	Ολικά λιπαρά οξέα, total fatty acids
<b>TOSC</b>	Total oxyradical scavenging capacity
<b>TP</b>	Ολικά φαινολικά, total phenolics
<b>TRAP</b>	Total radical-trapping antioxidant parameter
<b>UFA</b>	Ακόρεστα λιπαρά οξέα, unsaturated fatty acids
<b>UPGMA</b>	Unweighted pair group method with arithmetic mean
<b>VA</b>	Βανιλλικό οξύ, vanillic acid
<b>VAC</b>	Βαχενικό οξύ, vaccenic acid
<b>WI</b>	Δείκτης λευκότητας, whiteness index
<b>WL</b>	Απώλεια βάρους, weight loss

<b>Πίνακας 1. 1.</b> Γενετικό υλικό καρυδιάς, προέλευση, καταγωγή και γενεαλογία	44
<b>Πίνακας 1. 2.</b> Γενετικό υλικό καρυδιάς, χαρακτηριστικά του δένδρου και του καρπού.	46
<b>Πίνακας 1. 3.</b> Η νουκλεοτιδική αλληλουχία και τα χαρακτηριστικά της διακριτικής ικανότητας των ISSR μοριακών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν για το μοριακό χαρακτηρισμό των γονοτύπων καρυδιάς.	51
<b>Πίνακας 1. 4.</b> Τα μοναδικά ίχνη ενισχυμένων προϊόντων των 56 γονότυπων καρυδιάς, για τον κάθε εκκινητή και οι εκκινητές που απαιτούνται για την ταυτοποίηση του κάθε γονότυπου.	52
<b>Πίνακας 1. 5.</b> Ανάλυση της μοριακής διασποράς (AMOVA) των ελληνικών επιλογών καρυδιάς από τις πέντε περιοχές συλλογής.	58
<b>Πίνακας 1. 6.</b> Τιμές PhiPT και πιθανότητες μεταξύ των πέντε ελληνικών περιοχών συλλογής γονοτύπων καρυδιάς.	59
<b>Πίνακας 2. 1.</b> Γενική σύσταση, θρεπτικά στοιχεία και βιταμίνες του σπέρματος του καρυδιού (Ανασκόπηση βιβλιογραφίας).	75
<b>Πίνακας 2. 2.</b> Βιβλιογραφική ανασκόπηση ολικών φαινολικών (TP) και ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) καρυδιών.	78
<b>Πίνακας 2. 3.</b> Ποσοστιαία περιεκτικότητα κλασμάτων λιπαρών οξέων (FA) καρυδέλαιου σε κορεσμένα (SFA) ακόρεστα (UFA), μόνο-ακόρεστα (MUFA) και πολύ-ακόρεστα (PUFA) (Ανασκόπηση βιβλιογραφίας).	79
<b>Πίνακας 2. 4.</b> Ποσοστιαία περιεκτικότητα των κύριων λιπαρών οξέων (FA) του καρυδέλαιου (Ανασκόπηση βιβλιογραφίας)	79
<b>Πίνακας 2. 5.</b> Ποσοστιαία περιεκτικότητα των δευτερευόντων λιπαρών οξέων (FA) του καρυδέλαιου (Ανασκόπηση βιβλιογραφίας).	80
<b>Πίνακας 2. 6.</b> Συγκέντρωση του O <sub>2</sub> , στις διάφορες δειγματοληψίες, εντός των συσκευασιών που είχαν πληρωθεί με διαφορετικά αέρια.	95
<b>Πίνακας 2. 7.</b> Εκατοστιαία περιεκτικότητα υγρασίας και καρυδελαίου σε σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς μετά την αποξήρανση.	96
<b>Πίνακας 2. 8.</b> Επίδραση της ποικιλίας ( <i>Pc</i> ) επί των παραμέτρων $L^*$ , $h^o$ , $C^*$ , WI του χρώματος, τα ολικά φαινολικά (TP) και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας εκτιμώμενης με τις μεθόδους FRAP και DPPH .	99
<b>Πίνακας 2. 9.</b> Επιδράσεις της ποικιλίας ( <i>Pc</i> ), του χρόνου συντήρησης ( <i>Ps</i> ) και της αλληλεπίδρασής τους ( $Pc \times s$ ) επί των παραμέτρων $L^*$ , $h^o$ , $C^*$ και WI του χρώματος των ολικών φαινολικών (TP) και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), εκτιμώμενη με τις μεθόδους FRAP και DPPH σε σπέρματα καρυδιών κατά τη συντήρηση υπό διάφορες συνθήκες.	100
<b>Πίνακας 2. 10.</b> Επιδράσεις της ποικιλίας ( <i>Pc</i> ), της θερμοκρασίας συντήρησης ( <i>Pt</i> ) και του αερίου συσκευασίας ( <i>Pg</i> ) επί των παραμέτρων $L^*$ , $h^o$ , $C^*$ και WI του χρώματος σε σπέρματα καρυδιών σε διάφορους χρόνους συντήρησης.	101

<b>Πίνακας 2. 11.</b> Επιδράσεις της ποικιλίας ( <i>Pc</i> ), της θερμοκρασίας συντήρησης ( <i>Pt</i> ) και του αερίου συσκευασίας ( <i>Pg</i> ) επί των ολικών φαινολικών (TP) και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), εκτιμώμενη με τις μεθόδους FRAP και DPPH σε σπέρματα καρυδιών σε διάφορους χρόνους συντήρησης.	103
<b>Πίνακας 2. 12.</b> Επίδραση της ποικιλίας ( <i>Pc</i> ) επί των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) και του βαθμού υπεροξειδίων (PV) στο καρυδέλαιο τεσσάρων ποικιλιών μετά την αποξήρανση.	106
<b>Πίνακας 2. 13.</b> Επιδράσεις της ποικιλίας ( <i>Pc</i> ) και του χρόνου συντήρησης ( <i>Ps</i> ) επί των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) και του βαθμού υπεροξειδίων (PV) στο καρυδέλαιο τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς κατά τη συντήρηση υπό διάφορες συνθήκες.	108
<b>Πίνακας 2. 14.</b> Επιδράσεις της ποικιλίας ( <i>Pc</i> ), της θερμοκρασίας συντήρησης ( <i>Pt</i> ) και του αερίου συσκευασίας ( <i>Pg</i> ) επί των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) και του βαθμού υπεροξειδίων (PV) του καρυδέλαιου σε σπέρματα καρυδιών μετά από 12 mo συντήρησης.	109
<b>Πίνακας 2. 15.</b> Επιδράσεις της ποικιλίας ( <i>Pc</i> ) επί των λιπαρών οξέων στο καρυδέλαιο τεσσάρων ποικιλιών μετά την αποξήρανση.	109
<b>Πίνακας 2. 16.</b> Επιδράσεις της ποικιλίας ( <i>Pc</i> ) επί των κλασμάτων λιπαρών οξέων στο καρυδέλαιο τεσσάρων ποικιλιών μετά την αποξήρανση.	110
<b>Πίνακας 2. 17.</b> Επιδράσεις της ποικιλίας ( <i>Pc</i> ) και του χρόνου συντήρησης ( <i>Ps</i> ) επί των λιπαρών οξέων του καρυδέλαιου σε σπέρματα καρυδιών κατά τη συντήρηση υπό διάφορες συνθήκες.	114
<b>Πίνακας 2. 18.</b> Επιδράσεις της ποικιλίας ( <i>Pc</i> ) και του χρόνου συντήρησης ( <i>Ps</i> ) επί των παραμέτρων του καρυδέλαιου σε σπέρματα καρυδιών κατά τη συντήρηση υπό διάφορες συνθήκες.	115
<b>Πίνακας 2. 19.</b> Επιδράσεις της ποικιλίας ( <i>Pc</i> ) της θερμοκρασίας συντήρησης ( <i>Ps</i> ) και του αερίου συσκευασίας ( <i>Pg</i> ) επί των λιπαρών οξέων (FA) του καρυδέλαιου σε σπέρματα καρυδιών μετά από 12 mo συντήρησης.	116
<b>Πίνακας 2. 20.</b> Επιδράσεις της ποικιλίας ( <i>Pc</i> ), της θερμοκρασίας συντήρησης ( <i>Ps</i> ) και του αερίου συσκευασίας ( <i>Pg</i> ) επί των κλασμάτων λιπαρών οξέων (FA) του καρυδέλαιου σε σπέρματα καρυδιών μετά από 12 mo συντήρησης.	117
<b>Πίνακας 2. 21.</b> Παράμετροι ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) των αντιοξειδωτικών παραμέτρων και των παραμέτρων του χρώματος στα ξερά σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών κατά τη συντήρηση.	118
<b>Πίνακας 2. 22.</b> Παράμετροι ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) των χαρακτηριστικών του καρυδέλαιου περιλαμβάνοντας είτε όλα, είτε τα κύρια χαρακτηριστικά στα ξερά σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών κατά τη συντήρηση.	121
<b>Πίνακας 2. 23.</b> Παράμετροι ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) των αντιοξειδωτικών παραμέτρων και των κύριων παραμέτρων του καρυδέλαιου στα ξερά σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών κατά τη συντήρηση.	124
<b>Πίνακας 3. 1.</b> Ταξινόμηση των φαινολικών ενώσεων με βάση τον αριθμό των ατόμων άνθρακα (C) στο μόριο.	154



<b>Πίνακας 3. 2.</b> Διαστάσεις και μέγεθος στα νωπά ολόκληρα ενδοκάρπια (OE) τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς κατά τη συγκομιδή.	181
<b>Πίνακας 3. 3.</b> Πιθανότητες των επιδράσεων της ποικιλίας ( <i>Pc</i> ) του χρόνου συντήρησης ( <i>Pt</i> ) και της αλληλεπίδρασης τους ( <i>Pc × t</i> ) επί της σκληρότητας του κελύφους στα νωπά ολόκληρα ενδοκάρπια (OE) τεσσάρων ποικιλιών κατά τη συντήρηση.	182
<b>Πίνακας 3. 4.</b> Απώλεια βάρους των νωπών ολόκληρων ενδοκαρπίων (OE) και των σπερμάτων τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς συντηρούμενα στον 1° C έως 40 d.	183
<b>Πίνακας 3. 5.</b> Αναπνοή των νωπών ολόκληρων ενδοκαρπίων (OE) και σπερμάτων τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς συντηρούμενα στον 1° C έως 40 d.	184
<b>Πίνακας 3. 6.</b> Πιθανότητες των επιδράσεων της ποικιλίας ( <i>Pc</i> ), του χρόνου συντήρησης ( <i>Pt</i> ), του τρόπου συντήρησης ( <i>Ps</i> ) και των αλληλεπιδράσεων τους επί των παραμέτρων <i>L*</i> , <i>h°</i> και <i>C*</i> του χρώματος στα νωπά σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς κατά τη συντήρηση.	186
<b>Πίνακας 3. 7.</b> Πιθανότητες των επιδράσεων της ποικιλίας ( <i>Pc</i> ), του χρόνου συντήρησης ( <i>Pt</i> ), του τρόπου συντήρησης ( <i>Ps</i> ) και των αλληλεπιδράσεων τους επί των ολικών φαινολικών (TP) και αντιοξειδωτικής ικανότητας, εκτιμούμενης με τις μεθόδους FRAP και DPPH στα νωπά σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς κατά τη συντήρηση.	190
<b>Πίνακας 3. 8.</b> Πιθανότητες των επιδράσεων της ποικιλίας ( <i>Pc</i> ), του χρόνου συντήρησης ( <i>Pt</i> ), της αποξήρανσης ( <i>Pd</i> ) και των αλληλεπιδράσεων τους επί της περιεκτικότητας σε υγρασία και των ολικών φαινολικών (TP) στα νωπά και ξερά σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς κατά τη συντήρηση νωπών ολόκληρων ενδοκαρπίων (OE).	192
<b>Πίνακας 3. 9.</b> Πιθανότητες των επιδράσεων του χρόνου συντήρησης ( <i>Pt</i> ), της θερμοκρασίας ( <i>Pte</i> ) και της αλληλεπίδρασης τους ( <i>Pt × te</i> ) επί των ολικών φαινολικών (TP), της αντιοξειδωτικής ικανότητας (εκτιμούμενη με τις μεθόδους FRAP και DPPH) και των μεμονωμένων φαινολικών στα νωπά σπέρματα καρυδιάς της ποικιλίας Franquette κατά τη συντήρηση.	194
<b>Πίνακας 3. 10.</b> Πιθανότητες των επιδράσεων του χρόνου συντήρησης ( <i>Pt</i> ), των χειρισμών ( <i>Ptr</i> ) και της αλληλεπίδρασης τους ( <i>Pt × tr</i> ) επί των ολικών φαινολικών στα νωπά σπέρματα καρυδιάς της ποικιλίας Franquette κατά τη συντήρηση.	196
<b>Πίνακας 3. 11.</b> Πιθανότητες της επίδρασης των χειρισμών ( <i>Ptr</i> ) επί των ολικών και μεμονωμένων φαινολικών στα νωπά σπέρματα καρυδιάς της ποικιλίας Franquette κατά τη συντήρηση.	198
<b>Πίνακας 3. 12.</b> Πιθανότητες της επίδρασης των χειρισμών ( <i>Ptr</i> ) επί των ενεργοτήτων των ενζύμων φαινυλαλανίνη αμμωνία-λυάση (PAL), πολυφαινόλ-οξειδάση (PPO) και υπεροξειδάση (POD) στα νωπά σπέρματα καρυδιάς της ποικιλίας Franquette κατά τη συντήρηση.	206
<b>Πίνακας 3. 13.</b> Παράμετροι ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) των αντιοξειδωτικών παραμέτρων στα νωπά σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς κατά τη συντήρηση.	212
<b>Πίνακας 3. 14.</b> Παράμετροι ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) των αντιοξειδωτικών παραμέτρων και των φαινολικών συστατικών στα νωπά σπέρματα καρυδιάς της ποικιλίας	213

Franquette κατά τη συντήρηση.

- Πίνακας 4. 1.** Χαρακτηριστικά ολόκληρων ενδοκαρπίων (OE) και σπερμάτων καρυδιών της ποικιλίας Franquette σε δύο συγκομιδές υπό την επίδραση επέμβασης δακτυλίωσης. 259
- Πίνακας 4. 2.** Παράμετροι  $L^*$ ,  $h^o$  και  $C^*$  του χρώματος των σπερμάτων καρυδιών της ποικιλίας Franquette σε δύο συγκομιδές υπό την επίδραση επέμβασης δακτυλίωσης. 260
- Πίνακας 4. 3.** Πιθανότητες των επιδράσεων της συγκομιδής ( $Ph$ ), της επέμβασης ( $Ptr$ ) και της αλληλεπίδρασής τους ( $Ph \times tr$ ) επί των ολικών φαινολικών (TP) και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), εκτιμούμενης με τις μεθόδους FRAP και DPPH, στα σπέρματα καρυδιών της ποικιλίας Franquette. 260
- Πίνακας 4. 4.** Διαλυτά σάκχαρα (SS) των σπερμάτων καρυδιών της ποικιλίας Franquette σε δύο συγκομιδές υπό την επίδραση επέμβασης δακτυλίωσης. 262
- Πίνακας 4. 5.** Ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) και βαθμός υπεροξειδίων (PV) του καρυδέλαιου της ποικιλίας Franquette σε δύο συγκομιδές υπό την επίδραση επέμβασης δακτυλίωσης. 263
- Πίνακας 4. 6.** Ποσοτικά προέχοντα λιπαρά οξέα (FA) του καρυδέλαιου της ποικιλίας Franquette σε δύο συγκομιδές υπό την επίδραση επέμβασης δακτυλίωσης. 264
- Πίνακας 4. 7.** Ποσοτικά δευτερεύοντα λιπαρά οξέα (FA) του καρυδέλαιου της ποικιλίας Franquette σε δύο συγκομιδές υπό την επίδραση επέμβασης δακτυλίωσης. 265
- Πίνακας 4. 8.** Κλάσματα λιπαρών οξέων (FA) του καρυδέλαιου της ποικιλίας Franquette σε δύο συγκομιδές υπό την επίδραση επέμβασης δακτυλίωσης. 265
- Πίνακας 4. 9.** Ρυθμός αφομοίωσης  $CO_2$  ( $A_{CO_2}$ ) και διαλυτά σάκχαρα (SS) φύλλων της ποικιλίας Franquette σε δύο δειγματοληψίες υπό την επίδραση επέμβασης δακτυλίωσης. 266

<b>Γράφημα 1. 1.</b> Κατανομή των συντελεστών ομοιότητας (Jaccard) μεταξύ των 56 γονοτύπων καρυδιάς και των ομάδων τους με βάση τον τόπο καταγωγής τους, που προέκυψαν κατά τη μελέτη τους με επτά ISSR εκκινητές.	56
<b>Γράφημα 2. 1.</b> Παράμετροι $L^*$ και $WI$ του χρώματος στα αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς συντηρημένα σε συσκευασίες υπό διαφορετικά αέρια (air, $N_2$ , $CO_2$ ) στον $1^\circ C$ ή τους $20^\circ C$ έως 12 mo.	97
<b>Γράφημα 2. 2.</b> Παράμετροι $h^o$ και $C^*$ του χρώματος στα αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς συντηρημένα σε συσκευασίες υπό διαφορετικά αέρια (air, $N_2$ , $CO_2$ ) στον $1^\circ C$ ή τους $20^\circ C$ έως 12 mo.	98
<b>Γράφημα 2. 3.</b> Ολικά φαινολικά (TP) στα αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς συντηρημένα σε συσκευασίες υπό διαφορετικά αέρια (air, $N_2$ , $CO_2$ ) στον $1^\circ C$ ή τους $20^\circ C$ έως 12 mo.	102
<b>Γράφημα 2. 4.</b> Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), εκτιμώμενη με τη μέθοδο FRAP στα αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς συντηρημένα σε συσκευασίες υπό διαφορετικά αέρια (air, $N_2$ , $CO_2$ ) στον $1^\circ C$ ή τους $20^\circ C$ έως 12 mo.	104
<b>Γράφημα 2. 5.</b> Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), εκτιμώμενη με τη μέθοδο DPPH στα αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς συντηρημένα σε συσκευασίες υπό διαφορετικά αέρια (air, $N_2$ , $CO_2$ ) στον $1^\circ C$ ή τους $20^\circ C$ έως 12 mo.	105
<b>Γράφημα 2. 6.</b> Ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) και βαθμός υπεροξειδίων (PV) στο καρυδέλαιο σπερμάτων τεσσάρων ποικιλιών συντηρημένα σε συσκευασίες υπό διαφορετικά αέρια (air, $N_2$ , $CO_2$ ) στον $1^\circ C$ ή τους $20^\circ C$ έως 12 mo.	107
<b>Γράφημα 2. 7.</b> Κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA) στο καρυδέλαιο σπερμάτων τεσσάρων ποικιλιών συντηρημένα σε συσκευασίες υπό διαφορετικά αέρια (air, $N_2$ , $CO_2$ ) στον $1^\circ C$ ή τους $20^\circ C$ έως 12 mo.	110
<b>Γράφημα 2. 8.</b> Μονο-ακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA) στο καρυδέλαιο σπερμάτων τεσσάρων ποικιλιών συντηρημένα σε συσκευασίες υπό διαφορετικά αέρια (air, $N_2$ , $CO_2$ ) στον $1^\circ C$ ή τους $20^\circ C$ έως 12 mo.	111
<b>Γράφημα 2. 9.</b> Πολύ-ακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) στο καρυδέλαιο σπερμάτων τεσσάρων ποικιλιών συντηρημένα σε συσκευασίες υπό διαφορετικά αέρια (air, $N_2$ , $CO_2$ ) στον $1^\circ C$ ή τους $20^\circ C$ έως 12 mo.	111
<b>Γράφημα 2. 10.</b> Ολικά λιπαρά οξέα (TFA), λόγοι ακόρεστων/κορεσμένων (UFA/SFA) και $\omega$ -3/ $\omega$ -6 λιπαρών οξέων στο καρυδέλαιο σπερμάτων τεσσάρων ποικιλιών συντηρημένα σε συσκευασίες υπό διαφορετικά αέρια (air, $N_2$ , $CO_2$ ) στον $1^\circ C$ ή τους $20^\circ C$ έως 12 mo.	112
<b>Γράφημα 2. 11.</b> SFA, UFA, MUFA, PUFA στο καρυδέλαιο σπερμάτων τεσσάρων ποικιλιών συντηρημένα σε συσκευασίες υπό διαφορετικά αέρια (air, $N_2$ , $CO_2$ ) στον $1^\circ C$ ή τους $20^\circ C$ έως 12 mo.	113
<b>Γράφημα 2. 12.</b> (A) Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) και (B) ανάλυση συσχέτισης των αντιοξειδωτικών παραμέτρων και των παραμέτρων του χρώματος στα αποξηραμένα	119

σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς κατά τη συντήρηση.

**Γράφημα 2. 13.** Ανά ποικιλία αναλύσεις κύριων συνιστωσών (PCA) και αναλύσεις συσχέτισης των αντιοξειδωτικών παραμέτρων και των παραμέτρων του χρώματος στα αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς κατά τη συντήρηση. 120

**Γράφημα 2. 14.** (A) Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) και (B) ανάλυση συσχέτισης των χαρακτηριστικών του καρυδέλαιου στα αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς κατά τη συντήρηση. 122

**Γράφημα 2. 15.** (A) Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) και (B) ανάλυση συσχέτισης των χαρακτηριστικών του καρυδέλαιου εξαιρουμένων των κορεσμένων λιπαρών οξέων στα αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς κατά τη συντήρηση. 123

**Γράφημα 2. 16.** (A) Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) και (B) ανάλυση συσχέτισης των αντιοξειδωτικών παραμέτρων και των κύριων χαρακτηριστικών του καρυδέλαιου στα αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς κατά τη συντήρηση. 125

**Γράφημα 2. 17.** Τρισδιάστατη απεικόνιση των τιμών των κυρίων συνιστωσών (score plot) από την ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) των αντιοξειδωτικών παραμέτρων και των κύριων χαρακτηριστικών του καρυδέλαιου στα αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς κατά τη συντήρηση. 125

**Γράφημα 2. 18.** Ανά ποικιλία αναλύσεις κύριων συνιστωσών (PCA) και αναλύσεις συσχέτισης των αντιοξειδωτικών παραμέτρων και των κύριων χαρακτηριστικών του καρυδέλαιου στα αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς κατά τη συντήρηση. 126

**Γράφημα 3. 1.** Σκληρότητα κελύφους στα νωπά ολόκληρα ενδοκάρπια (OE) τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς συντηρούμενες στον 1° C έως 40 d. 182

**Γράφημα 3. 2.** Παράμετροι  $L^*$ ,  $h^o$  και  $C^*$  του χρώματος στα νωπά σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς συντηρημένα χωρίς- (shelled) ή με- (in-shell) κέλυφος στον 1° C έως 40 d. 185

**Γράφημα 3. 3.** Ολικά φαινολικά στα νωπά σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς συντηρημένα χωρίς- (shelled) ή με- (in-shell) κέλυφος στον 1° C έως 40 d. 188

**Γράφημα 3. 4.** Αντιοξειδωτική ικανότητα, εκτιμούμενη με τις μεθόδους FRAP και DPPH, στα νωπά σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς συντηρημένα χωρίς- (shelled) ή με- (in-shell) κέλυφος στον 1° C έως 40 d. 189

**Γράφημα 3. 5.** Περιεκτικότητα σε υγρασία στα νωπά και αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς που προέκυψαν μετά από τη συντήρηση νωπών ολόκληρων ενδοκαρπίων (OE) στον 1° C έως 20 d. 191

**Γράφημα 3. 6.** Ολικά φαινολικά στα νωπά και αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς που προέκυψαν μετά από τη συντήρηση νωπών ολόκληρων ενδοκαρπίων (OE) στον 1° C έως 20 d. 191

**Γράφημα 3. 7.** Ολικά και μεμονωμένα φαινολικά στα νωπά σπέρματα καρυδιάς της ποικιλίας Franquette συντηρημένα στον 1° C ή στους 8° C έως 30 d. 193

<b>Γράφημα 3. 8.</b> Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, εκτιμώμενη με τις μεθόδους FRAP και DPPH, στα νωπά σπέρματα καρυδιάς της ποικιλίας Franquette συντηρημένα στον 1° C ή στους 8° C έως 30 d.	194
<b>Γράφημα 3. 9.</b> Ολικά φαινολικά στα νωπά σπέρματα καρυδιάς της ποικιλίας Franquette εμβαπτισμένα σε διάφορες ουσίες και συντηρημένα στον 1° C ή στους 8° C έως 30 d.	195
<b>Γράφημα 3. 10.</b> Ολικά φαινολικά στα νωπά σπέρματα καρυδιάς της ποικιλίας Franquette εμβαπτισμένα σε διάφορες ουσίες και συντηρημένα στον 1° C για 20 d.	198
<b>Γράφημα 3. 11.</b> Συγκέντρωση 4-υδροξύβενζοϊκού οξέως (HB) στα νωπά σπέρματα καρυδιάς της ποικιλίας Franquette εμβαπτισμένα σε διάφορες ουσίες και συντηρημένα στον 1° C για 20 d.	199
<b>Γράφημα 3. 12.</b> Συγκέντρωση 2,4-διϋδροξύβενζοϊκού οξέως (DHB) στα νωπά σπέρματα καρυδιάς της ποικιλίας Franquette εμβαπτισμένα σε διάφορες ουσίες και συντηρημένα στον 1° C για 20 d.	200
<b>Γράφημα 3. 13.</b> Συγκέντρωση πρωτοκατεχικού οξέως (PC) στα νωπά σπέρματα καρυδιάς της ποικιλίας Franquette εμβαπτισμένα σε διάφορες ουσίες και συντηρημένα στον 1° C για 20 d.	201
<b>Γράφημα 3. 14.</b> Συγκέντρωση αιθυλεστέρα πρωτοκατεχικού οξέως (PCE) στα νωπά σπέρματα καρυδιάς της ποικιλίας Franquette εμβαπτισμένα σε διάφορες ουσίες και συντηρημένα στον 1° C για 20 d.	202
<b>Γράφημα 3. 15.</b> Συγκέντρωση βανιλικού οξέως (VA) στα νωπά σπέρματα καρυδιάς της ποικιλίας Franquette εμβαπτισμένα σε διάφορες ουσίες και συντηρημένα στον 1° C για 20 d.	203
<b>Γράφημα 3. 16.</b> Συγκέντρωση συρινγικού οξέως (SY) στα νωπά σπέρματα καρυδιάς της ποικιλίας Franquette εμβαπτισμένα σε διάφορες ουσίες και συντηρημένα στον 1° C για 20 d.	204
<b>Γράφημα 3. 17.</b> Συγκέντρωση ελλαγικού οξέως (EL) στα νωπά σπέρματα καρυδιάς της ποικιλίας Franquette εμβαπτισμένα σε διάφορες ουσίες και συντηρημένα στον 1° C για 20 d.	205
<b>Γράφημα 3. 18.</b> Ειδική και ολική ενεργότητα του ενζύμου φαινυλαλανίνη-αμμωνία λυάση (PAL) στα νωπά σπέρματα της ποικιλίας Franquette εμβαπτισμένα σε διάφορες ουσίες και συντηρημένα στον 1° C για 20 d, την 4 <sup>η</sup> Π.	207
<b>Γράφημα 3. 19.</b> Ειδική και ολική ενεργότητα του ενζύμου πολυφαινόλ-οξειδάση (PPO) στα νωπά σπέρματα καρυδιάς της ποικιλίας Franquette εμβαπτισμένα σε διάφορες ουσίες και συντηρημένα στον 1° C για 20 d.	209
<b>Γράφημα 3. 20.</b> Ειδική και ολική ενεργότητα του ενζύμου υπεροξειδάση (POD) στα νωπά σπέρματα καρυδιάς της ποικιλίας Franquette εμβαπτισμένα σε διάφορες ουσίες και συντηρημένα στον 1° C για 20 d.	211
<b>Γράφημα 3. 21.</b> (A) Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) και (B) ανάλυση συσχέτισης των αντιοξειδωτικών παραμέτρων στα νωπά σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς κατά τη συντήρηση.	212
<b>Γράφημα 3. 22.</b> (A) Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) και (B) ανάλυση συσχέτισης των αντιοξειδωτικών παραμέτρων και επτά φαινολικών συστατικών στα νωπά σπέρματα	214

καρυδιάς της ποικιλίας Franquette κατά τη συντήρηση.

**Γράφημα 4. 1.** Ποσοστά των σταδίων ωριμότητας των καρπών καρυδιάς ποικιλίας Franquette συγκομισμένους σε δύο χρόνους από κλάδους που είχαν δεχτεί επέμβαση ή όχι με δακτυλίωση. 258

**Γράφημα 4. 2.** Ολικά φαινολικά (TP) των σπερμάτων καρυδιάς ποικιλίας Franquette συγκομισμένων σε δύο χρόνους από κλάδους που είχαν δεχτεί επέμβαση ή όχι με δακτυλίωση. 261

**Γράφημα 4. 3.** Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), εκτιμώμενη με τις μεθόδους FRAP και DPPH, των σπερμάτων καρυδιάς ποικιλίας Franquette συγκομισμένων σε δύο χρόνους από κλάδους που είχαν δεχτεί επέμβαση ή όχι με δακτυλίωση. 262

<b>Σχήμα 2. 1.</b> Χρωματογραφικό διάγραμμα των παραμέτρων του $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ , $h^o$ και $C^*$ .	88
<b>Σχήμα 2. 2.</b> Αναγωγή του συμπλόκου $Fe^{3+}$ -TPTZ σε $Fe^{2+}$ -TPTZ παρουσία αντιοξειδωτικού (κατά Huang et al., 2005).	90
<b>Σχήμα 2. 3.</b> Η ρίζα DPPH (2,2- διφαινύλ-1-πυκριδραζύλ) (κατά Huang et al., 2005).	90
<b>Σχήμα 3. 1.</b> Η χαρακτηριστική ομάδα της φαινόλης (μετατροπή από Bravo, 1998)	154
<b>Σχήμα 3. 2.</b> Συνοπτική παρουσίαση βιοσύνθεσης των διαφόρων κλάσεων φαινολικών ενώσεων.	156
<b>Σχήμα 3. 3.</b> Χημική δομή των ευρέως διαδεδομένων υδροξυβενζοϊκών οξέων (Προσαρμογή από Shahidi and Nacz, 2004).	158
<b>Σχήμα 3. 4.</b> Τα δύο πιθανά μονοπάτια βιοσύνθεσης των υδροξυβενζοϊκών οξέων μέσω των αντίστοιχων υδροξυκιναμικών ως πρόδρομων (Προσαρμογή από Strack, 1997).	159
<b>Σχήμα 3. 5.</b> Χημική δομή των ευρέως διαδεδομένων υδροξυκιναμικών οξέων (Προσαρμογή από Shahidi and Nacz, 2004).	160
<b>Σχήμα 3. 6.</b> Βασική δομή κινονών και η ναφθοκινόνη γιουγκλόνη που αποτελεί χαρακτηριστικό συστατικό στα διάφορα μέρη της καρδιάς (Προσαρμογή από Strack, 1997).	161
<b>Σχήμα 3. 7.</b> Η χημική δομή των διαφόρων κλάσεων των φλαβονοειδών και τα ευρέως διαδεδομένα στα φυτά (Προσαρμογή από Crozier et al., 2009).	163
<b>Σχήμα 3. 8.</b> Η δομή των δευτερευόντων φλαβονοειδών (Προσαρμογή από Goodwin and Mercer, 1983).	164
<b>Σχήμα 3. 9.</b> Η βασική δομή των ομάδων των ταννινών (Προσαρμογή από Khanbabaee and van Ree, 2001).	165
<b>Σχήμα 3. 10.</b> 2-Aminoindane-2-phosphonic acid ή AIP (Προσαρμογή από Zon et al., 2004).	170
<b>Σχήμα 3. 11.</b> Οι δύο πιθανοί μηχανισμοί της παρεμποδιστικής δράσης της AIP επί της PAL (Προσαρμογή από Appert et al., 2003)	171
<b>Σχήμα 3. 12.</b> Actinomycin D.	171
<b>Σχήμα 3. 13.</b> Cordycepin ή 3'-deoxyadenosin.	172
<b>Σχήμα 3. 14.</b> Cycloheximide (Προσαρμογή από Schneider-Poetsch et al., 2010).	172

---

<b>Εικόνα 1. 1.</b> Περιοχές συλλογής των ελληνικών επιλογών καρδιάς που εξετάσθηκαν στην παρούσα μελέτη.	43
<b>Εικόνα 1. 2.</b> Ενισχυμένα προϊόντα γονότυπων καρδιάς με μοριακούς δείκτες ISSR. a) εκκινητής UBC-818, b) εκκινητής UBC-859.	52
<b>Εικόνα 1. 3.</b> Οι δύο μοναδικές ζώνες που εμφάνισε ο γονότυπος Sibisel 39, στα 590 και 650 bp με τη χρήση του εκκινητή 817.	54
<b>Εικόνα 1. 4.</b> Δενδρογράμμα με βάση την ανάλυση UPGMA των συντελεστών ομοιότητας του Jaccard που προέκυψαν από την μελέτη 56 γονότυπων καρδιάς με επτά ISSR εκκινητές.	57
<b>Εικόνα 2. 1.</b> Σημείο σπέρματος στο οποίο γινόταν η λήψη της μέτρησης του χρώματος.	88





## Γενική Περίληψη

Ο αντικειμενικός σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν ο μοριακός χαρακτηρισμός του ελληνικού γενετικού δυναμικού της καρυδιάς (*Juglans regia* L.) και η μελέτη παραγόντων που επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά των καρπών της που εκτιμώνται ιδιαίτερα σε διεθνές επίπεδο για τη θρεπτική τους αξία.

Η Ελλάδα είναι από τις πρώτες γεωγραφικές περιοχές της Ευρώπης όπου καλλιεργήθηκε η καρυδιά. Ωστόσο, δεν υπάρχουν στοιχεία για τη γενετική παραλλακτικότητα και τις γενετικές σχέσεις μεταξύ των διεθνώς καλλιεργούμενων ποικιλιών και των ελληνικών τοπικών πληθυσμών καρυδιάς, οι οποίες εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη με τη χρήση ISSR (Inter Simple Sequence Repeat -Ενδο-μικροδορυφορικές επαναλήψεις) δεικτών. Από τα αποτελέσματα προέκυψε η ύπαρξη υψηλής γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ των 56 εξεταζόμενων γονοτύπων, με τις περισσότερες διεθνείς ποικιλίες να αποτελούν μια διακριτή ομάδα, σε αντίθεση με τις ελληνικές επιλογές οι οποίες δεν μπορούν να θεωρηθούν σαν ένα ομοιογενές σύνολο. Στην ομάδα των διεθνών ποικιλιών διακρίθηκαν δύο υποομάδες, όπου στη μια συμμετέχουν κυρίως ποικιλίες που έχουν την 'Payne' στη γενεαλογία τους, ενώ στη δεύτερη συμμετέχουν ποικιλίες που έχουν την 'Franquette' στη γενεαλογία τους ή είναι γαλλικές επιλογές. Η υψηλή παραλλακτικότητα του ελληνικού γενετικού υλικού που αποκαλύφθηκε, κατανεμήθηκε κυρίως εντός των γεωγραφικών περιοχών καλλιέργειάς τους παρά μεταξύ αυτών, γεγονός που καθιστά επιτακτική την ανάγκη προστασίας και διατήρησης του υλικού αυτού.

Τα αποξηραμένα σπέρματα του καρπού της καρυδιάς αποτελούν το κύριο προϊόν της καλλιέργειας της, τα οποία θεωρούνται μοναδικά μεταξύ των ξηρών καρπών και των φυτικών τροφών γενικότερα, καθώς έχουν πολύ ισχυρή ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) και εξαιρετική σύσταση καρυδέλαιου σε λιπαρά οξέα (FA). Η μελέτη αποξηραμένων σπερμάτων τεσσάρων ποικιλιών (Chandler, Franquette, Hartley, Ιόλη) έδειξε για όλες τις ποικιλίες πολύ υψηλά επίπεδα ολικών φαινολικών (TP), TAC (εκτιμώμενη με τις μεθόδους FRAP και DPPH) και το κλάσμα πολύ-ακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA). Προσδιορίστηκαν τα λιπαρά οξέα μυριστικό, παλμιτικό, παλμιτελαϊκό, στεαρικό, ελαϊκό (OL), βαχενικό, λινελαϊκό (LL), λινολενικό (LN), αραχιδικό και γονδοϊκό. Κατά τη συντήρηση έως και 12 mo, παρατηρήθηκαν προοδευτικό καφέτιασμα (μείωση  $h^o$  και  $L^*$ ), αύξηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) και του βαθμού υπεροξειδίων (PV), μεγάλες απώλειες TP και TAC, και σχετικά μικρές απώλειες των κλασμάτων των μόνο-ακόρεστων λιπαρών οξέων (MUFA), PUFA, καθώς και των OL, LL ( $\omega$ -6) και LN ( $\omega$ -3). Η μεγαλύτερη υποβάθμιση της ποιότητας και της θρεπτικής αξίας παρατηρήθηκε σε θερμοκρασία συντήρησης 20° C ή/και σε συσκευασία αέρα, ενώ η χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης (1° C) ή/και η συσκευασία σε N<sub>2</sub>

ή CO<sub>2</sub> περιόρισαν το καφέτιασμα, τις αυξήσεις των FFA και PV, καθώς και τις απώλειες των TP, TAC, MUFA, PUFA, OL, LL και LN. Οι θετικές επιδράσεις της χαμηλής θερμοκρασίας και του μειωμένου O<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα συντήρησης ήταν προσθετική. Παρατηρήθηκε στενή σχέση μεταξύ TP και TAC, αλλά και μεταξύ TP και καφετιάσματος των σπερμάτων. Παράλληλα, βρέθηκε αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στο τάγγισμα (FFA, PV) και τα ακόρεστα λιπαρά οξέα (UFA), PUFA και LL και επιπρόσθετα παρατηρήθηκε ότι υπάρχει μια προστατευτική δράση των ενδογενών αντιοξειδωτικών επί της οξείδωσης των UFA του καρυδέλαιου.

Οι μη αποξηραμένοι καρποί καρυδιάς (νωπά ή φρέσκα καρύδια) αποτελούν ένα λιγότερο διαδεδομένο προϊόν της καλλιέργειας αυτού του φυτικού είδους, για το οποίο δεν υπάρχουν στοιχεία που αφορούν την ποιότητα και τη συντήρηση του. Από τη μελέτη της συντήρησης, νωπών σπερμάτων από τις τέσσερις ποικιλίες που μελετήθηκαν ως αποξηραμένες, προέκυψε η δυνατότητα συντήρησης και των τεσσάρων ποικιλιών τουλάχιστο μέχρι 40 d στον 1° C. Κατά τη συντήρηση, παρατηρήθηκε απώλεια βάρους και μείωση του ρυθμού αναπνοής, προοδευτικό καφέτιασμα, χωρίς άλλη αλλοίωση, αλλά σημαντική αύξηση των επιπέδων TP και TAC, ενώ η έκλυση αιθυλενίου ήταν μη ανιχνεύσιμη. Η συντήρηση των σπερμάτων με-κέλυφος περιόρισε ελαφρά το καφέτιασμα, χωρίς όμως να έχει επίδραση επί των TP και της TAC, ενώ αλλαγές στη σκληρότητα του κελύφους δεν παρατηρήθηκαν. Σε καρύδια που αποξηράθηκαν μετά την έκθεσή τους ως νωπά στον 1° C έως και 20 d, η βελτίωση της θρεπτικής αξίας των σπερμάτων μέσω της αύξησης των TP παρέμεινε ακόμα και μετά την αποξήρανση. Η έκθεση νωπών σπερμάτων 'Franquette' χωρίς κέλυφος στον 1° C συνετέλεσε σε αυξήσεις συγκεντρώσεων των φαινολικών οξέων 4-υδροξυβενζοϊκό (HB), 2,4-διυδροξυβενζοϊκό (DHB), βανιλλικό (VA), συρινγικό (SY), πρωτοκατεχικό (PC) και ελλαγικό (EL) παράλληλα με τις αυξήσεις των TP και TAC. Αντίθετα, οι παραπάνω αυξήσεις δεν παρατηρήθηκαν κατά την έκθεση των σπερμάτων στους 8° C, εκτός από μικρές αυξήσεις των HB και SY. Ο αιθυλεστερας του πρωτοκατεχικού (PCE) παρουσίασε μείωση σε όλες τις συνθήκες. Όλα τα φαινολικά ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση φασματογράφου μαζών (HPLC-MS) και τα DHB και PCE προσδιορίστηκαν για πρώτη φορά στην καρυδιά. Οι αυξήσεις των φαινολικών στον 1° C πιθανόν να προήλθαν από την ενεργοποίηση του μεταβολισμού των φαινυλπροπανοειδών (PhP), καθώς παρατηρήθηκαν αυξημένες ενεργότητες (ειδική και ολική) του ενζύμου φαινυλαλανίνη αμμωνία-λύαση (PAL). Με τη χρήση παρεμποδιστών της δράσης της PAL, καθώς και της σύνθεσης mRNA, RNA και πρωτεϊνών βρέθηκε ότι η αύξηση της ενεργότητας (ειδικής και ολικής) των ενζύμων πολυφαινολοξειδάση (PPO) και υπεροξειδάση (POD), καθώς και της PAL προήλθε τόσο από την ενεργοποίησή τους όσο και πιθανόν από τη *de novo* σύνθεσή τους. Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων έδειξε ότι είναι πιθανόν η συσσώρευση των φαινολικών οξέων HB, DHB, VA και SY να γίνεται μέσω του

PhP, του PC εκτός του PhP, ενώ στη συσσώρευση του EL είναι πιθανόν να συνεισφέρει μερικώς το PhP.

Τέλος, εξετάστηκε η ποιότητα και η σύσταση των νωπών σπερμάτων της 'Franquette' 43 d και 84 d μετά την εφαρμογή δακτυλίωσης κατά το στάδιο έναρξης της ανάπτυξης του σπέρματος σε τετραετείς κλάδους. Κατά την ωρίμανση καρπών με ή χωρίς δακτυλίωση παρατηρήθηκε αύξηση των PUFA και του LL στο καρυδέλαιο παράλληλα με την αύξηση του βάρους και της ελαιοπεριεκτικότητας του σπέρματος. Αντίθετα, βρέθηκε πτωτική τάση των επιπέδων των TP, της TAC, των κορεσμένων λιπαρών οξέων (SFA) και του παλμιτικού οξέως (PA). Τόσο στα σπέρματα όσο και στα φύλλα η σακχαρόζη, φρουκτόζη και γλυκόζη είχαν πτωτική τάση στην πορεία του χρόνου, όπως επίσης παρόμοια πτωτική τάση είχε και ο ρυθμός αφομοίωσης CO<sub>2</sub> των φύλλων. Η δακτυλίωση οδήγησε σε πρωίμιση των καρπών και μεγαλύτερη ομοιομορφία του φορτίου, αυξημένο βάρος σπέρματος και ελαιοπεριεκτικότητα των ώριμων καρπών, ενώ δεν επηρέασε άλλα χαρακτηριστικά της ποιότητας του σπέρματος, τόσο με βάση την αντίληψη του καταναλωτή (χρώμα, FFA, PV), όσο και από την άποψη της θρεπτικής αξίας (TP, TAC, σύσταση καρυδέλαιου σε λιπαρά οξέα).

## *Abstract*

The objective of the present study was the molecular characterization of Greek walnut (*Juglans regia* L.) genetic material and the evaluation of factors that affect attributes and nutritional value of walnut endocarps.

Greece could be considered as a long-established region of walnut diversity with a vast gene pool resource. However, there are no data about germplasm diversity and genetic relationships among walnut international cultivars and Greek local selections. The results in the present work, by the use of Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers, showed the presence of a high degree of genetic variability among the 56 examined accessions. Most international cultivars were grouped together, while most Greek native populations could not be placed into a distinct group. The Greek native population genotypes were found to be more diverse than the international cultivars. In the cultivar group, two subgroups were distinguished; one consisted of genotypes involving 'Payne' and the other 'Franquette' in their pedigrees. Genetic variation was larger among Greek walnut populations within a collection region than among the regions. The high variability of Greek germplasm suggests the importance of conservation of landrace Greek walnut populations.

Dried kernels are the common product form of walnut cultivation. Among plant foodstuffs and especially nuts, walnut kernels are an excellent source of antioxidants and poly-unsaturated fatty acids (PUFA), especially omega-3 and omega-6. The study of dried kernels of four walnut cultivars (Chandler, Franquette, Hartley, Ioli) showed high levels of total phenolics (TP), total antioxidant capacity (TAC), assessed by FRAP and DPPH methods, and PUFA. The fatty acids (% in kernel oil) measured in this study were myristic, palmitic, palmitoleic, stearic, oleic (OL), vaccenic, linoleic (LL), linolenic (LL), arachidic and gondoic. Storage of kernels up to 12 mo resulted in browning and rancidity (hydrolytic and oxidative), high losses of TP and TAC, as well as, relatively low losses of mono-saturated fatty acids (MUFA), PUFA, OL, LL and LN. The highest deterioration of quality characteristics and particularly of nutritional value were observed at 20° C and/or under air, while the lower temperature (1° C) used and/or packaging under N<sub>2</sub> or CO<sub>2</sub> prevented additively the browning, the rancidity and the losses of TP, TAC, MUFA, PUFA, OL, LL and LN. Strong correlation was observed between TP and TAC, as well as between TP and kernel browning. Reverse correlation was found between rancidity and total unsaturated fatty acids (UFA), PUFA and LL. The results supported a probable protective effect of endogenous antioxidants against oxidation of UFA in walnut oil.

Non-processed and non-dried walnuts, the so called fresh or wet walnuts, are a less widespread product of walnut cultivation, with a lack of storability information. The

experiments showed that fresh walnut kernels of four cultivars (Chandler, Franquette, Hartley, Ioli) could be stored for at least 40 d at 1° C. During storage at 1° C, weight loss and decrease in respiration rates were observed along with browning, without any other decay, while no ethylene production was detected. On the contrary, great increases in TP and TAC were observed during storage, suggesting the enhancement of nutritional value of the product at 1° C. Exposure at 1° C for 20 d resulted in increased TP levels in walnuts even after drying in comparison with dried walnuts without prior exposure. Storage of in-shell kernels at 1° C resulted in a slight decrease in kernel browning, but had no effect on the increased TP and TAC levels in comparison with shelled ones. Shell strength did not change during the whole storage period. Exposure of 'Franquette' shelled kernels at 1° C resulted in increases in concentration of phenolic acids 4-hydroxybenzoic (HB), 2,4-dihydroxybenzoic (DHB), protocatechuic (PC), vanillic (VA), syringic (SY) and ellagic (EL) along with the increases in TP and TAC. By contrast, these variables remained almost stable at 8° C except for the increases in HB and SY. Protocatechuic ethyl ester (PCE) decreased at both temperatures. All phenolic compounds were identified by mass spectrometry (HPLC-MS), while DHB and PCE were first identified in walnut kernel in this study. At 1° C, phenolic increases could probably be derived from the induction of phenylpropanoid metabolism (PhP), since increased activities (specific and total) of the enzymes phenylalanine ammonia-lyase (PAL), polyphenoloxidase (PPO) and peroxidase (POD) were found. The use of inhibitors of PAL activity, as well as, of mRNA, RNA and protein synthesis revealed that the increased activities of PAL, PPO and POD were probably derived from both activation and *de novo* synthesis of these enzymes. The combined results at 1° C suggested that PhP was responsible for the increases in HB, DHB, VA and SY, but not for the increases in PC, whereas PhP contributed partially, to the biosynthesis of EL.

The quality and composition of 'Franquette' fresh walnuts were also studied 43 d and 84 d after branch girdling at the state of the beginning of kernel increase. During fruit maturation, increases in PUFA and LL in kernel oil were observed in all samples, along with the increases in kernel weight and oil content. By contrast, TP, TAC, saturated fatty acids (SFA) and PA decreased. In both kernels and leaves, concentrations of sucrose, fructose and glucose decreased and CO<sub>2</sub> assimilation rates of leaves reduced. Girdling resulted in precocity, improved uniformity of fruit load maturation, increased kernel weight and kernel oil content. Girdling had no negative effect on kernel quality according to either consumer perception (color, free fatty acids, peroxide value) or nutritional value (TP, TAC, oil composition in fatty acids).



# **ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

---

*Εξάπλωση και καλλιέργεια της καρδιάς παγκοσμίως και  
διατροφική αξία των καρπών της*





## ***I. Εξάπλωση και καλλιέργεια της καρδιάς παγκοσμίως***

Η καρύδια (*Juglans regia* L.) είναι δένδρο φυλλοβόλο, αγγειόσπερμο, δικότυλο και ανήκει στο γένος *Juglans* της οικογένειας Juglandaceae (Ποντίκης, 2000). Η Περσική ή Αγγλική καρυδιά (Persian ή English walnut), όπως αλλιώς ονομάζεται, αποτελεί το πιο σημαντικό από τα 21 είδη του γένους *Juglans* και καλλιεργείται παγκοσμίως κυρίως για τους καρπούς της και δευτερευόντως για το ξύλο της. Ο καρπός είναι δρύπη, με περικάρπιο χοντρό και σαρκώδες και ενδοκάρπιο ξυλοποιημένο. Το εδώδιμο μέρος του καρπού είναι το σπέρμα (ψίχα, EN: kernel) το οποίο συνήθως αναφέρεται ως καρύδι (walnut).

Οι καρποί της καρδιάς τρώγονται κυρίως αποξηραμένοι ή χρησιμοποιούνται στη ζαχαροπλαστική, την φαρμακοβιομηχανία και για την παραγωγή καρυδέλαιου (Ποντίκης, 2000; Prasad, 2003). Μεταξύ των δενδρωδών ειδών που καλλιεργούνται για την παραγωγή ξηρών καρπών (Tree nuts) η καρυδιά καταλαμβάνει την τρίτη θέση τόσο από την άποψη των καλλιεργούμενων εκτάσεων (846.059 εκτάρια) όσο και της παραγωγής (2.545.388 t). Η Κίνα και οι ΗΠΑ είναι οι κύριες χώρες παραγωγής καρυδιών, ενώ η Ελλάδα καταλαμβάνει την ένατη θέση παγκοσμίως με παραγωγή 22.200 t (FAOSTAT, 2009).

## ***II. Διατροφική αξία των καρπών της καρδιάς***

Τα καρύδια θεωρούνται μοναδικά μεταξύ των ξηρών καρπών και των φυτικών τροφών γενικότερα καθώς έχουν πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα και εξαιρετική σύσταση σε λιπαρά οξέα (Halvorsen et al., 2006). Ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα τους κατατάσσονται πέμπτα μεταξύ 1113 τροφών (Halvorsen et al., 2006) και οι αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες οφείλονται κυρίως στην υψηλή τους περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις (Fukuda et al., 2003; Halvorsen et al., 2002; Li et al., 2006). Εκτός όμως από τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, τα καρύδια έχουν και υψηλή περιεκτικότητα σε λάδι (60-70%) του οποίου το μεγαλύτερο ποσοστό αποτελείται από  $\omega$ -3 και  $\omega$ -6 πολύ-ακόρεστα λιπαρά οξέα (Amaral et al., 2003; Li et al., 2007; Pereira et al., 2008).

Τα τελευταία χρόνια, λόγω των παραπάνω θρεπτικών χαρακτηριστικών, δίνεται ιδιαίτερη βαρύτητα στη μελέτη της επίδρασης της διατροφής καρυδιών στην υγεία του ανθρώπου. Συγκεκριμένα, εργαστηριακές και επιδημιολογικές μελέτες αναφέρουν την εξαιρετική επίδραση των καρυδιών στη ρύθμιση της χοληστερόλης στο αίμα, μειώνοντας τα τρι-γλυκερίδια, τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης και αυξάνοντας την HDL χοληστερόλη (Almaro et al., 2001; Anderson et al., 2001; Iwamoto et al., 2000; Prineas et al., 1993; Ros et al., 2004; Sabate et al., 1993; Zambón et al., 2000; Zibaenezhad et al., 2003; Zibaenezhad et al., 2005). Παράλληλα η ενσωμάτωση καρυδιών στη διατροφή επιδρά θετικά στην πρόληψη της στεφανιαίας νόσου (CHD) και των καρδιαγγειακών παθήσεων (Albert et al., 1998; Blomhoff et al., 2006; Feldman, 2002; Fraser et al., 1992; Hu et al., 1998; Kris-Etherton et al.,

2000; Medeiros, 2000; Morgan et al., 2002; Papoutsi et al., 2008; Ros and Mataix, 2006). Τέλος, σε πρόσφατες έρευνες αναφέρεται ότι τα καρύδια έχουν θετική επίδραση στην πρόληψη της οστεοπόρωσης (Papoutsi et al., 2008), στη διαίτα ατόμων με διαβήτη (Fukuda et al., 2004; Gillen et al., 2005; Tapsell et al., 2004), αντί-αιμολυτικές ιδιότητες και παρεμποδιστική δράση στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του νεφρού (Carvalho et al., 2010).

Οι θετικές επιδράσεις των καρυδιών στην υγεία του ανθρώπου, που αποκαλύπτονται τα τελευταία χρόνια, πιθανόν να είναι υπεύθυνες για την αύξηση των εισαγωγών που παρατηρείται την τελευταία πενταετία στις ανεπτυγμένες χώρες και την Ευρωπαϊκή Ένωση (FAOSTAT, 2008). Παράλληλα η αυξημένη ζήτηση του καταναλωτικού κοινού, για αυτό το είδος καρπού, έχει οδηγήσει στην προσπάθεια εύρεσης ποικιλιών καρυδιάς με συγκεκριμένα ποιοτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο τα δεδομένα που αφορούν τα χαρακτηριστικά αυτά και το γενετικό δυναμικό της καρυδιάς είναι σχετικά περιορισμένα.

### ***III. Αντικειμενικός σκοπός της παρούσας διατριβής***

Ο αντικειμενικός σκοπός της παρούσας διατριβής είναι ο μοριακός χαρακτηρισμός του γενετικού δυναμικού της καρυδιάς και η μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά των καρπών της, με έμφαση στις φαινολικές ενώσεις, στην αντιοξειδωτική ικανότητα και τη σύσταση του καρυδέλαιου. Ο παραπάνω γενικός σκοπός αναλύεται σε τέσσερα κεφάλαια των οποίων οι επιμέρους στόχοι είναι:

**Κεφάλαιο 1:** Η εκτίμηση της χρήσης των μοριακών δεικτών ISSR για τη μελέτη του γενετικού υλικού της καρυδιάς και παράλληλα η μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας και των γενετικών σχέσεων γονότυπων, με έμφαση στις πιο διαδεδομένες ποικιλίες και τους ελληνικούς τοπικούς πληθυσμούς καρυδιάς.

**Κεφάλαιο 2:** Η μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας, της ατμόσφαιρας αερίου σύστασης και του χρόνου συντήρησης επί των φαινολικών ενώσεων, της αντιοξειδωτικής ικανότητας, της σύστασης του καρυδέλαιου και των ποιοτικών χαρακτηριστικών των αποξηραμένων καρπών, τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς.

**Κεφάλαιο 3:** Η μελέτη της μετά-συλλεκτικής συμπεριφοράς των νωπών καρυδιών. Η επίδραση της χαμηλής θερμοκρασίας επί των φαινολικών συστατικών των καρυδιών καθώς και βιοχημικών παραγόντων που πιθανόν να επηρεάζουν το μεταβολισμό των φαινολικών ενώσεων.

**Κεφάλαιο 4:** Η μελέτη της επίδρασης της χαραγής-δακτυλίωσης επί των καρπολογικών χαρακτηριστικών και ορισμένων χαρακτηριστικών των φύλλων της καρυδιάς.

Η καλλιέργεια της καρυδιάς τα προσεχή χρόνια ενδέχεται να αποτελέσει μια ισχυρά δυναμική καλλιέργεια, λόγω της αυξανόμενης ζήτησης και των ενδείξεων για την εξαιρετική

επίδραση των καρυδιών στην ανθρώπινη υγεία. Ιδιαίτερα για τη χώρα μας η καλλιέργεια ποικιλιών καρυδιάς με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά μπορεί να αποτελέσει μια προτεινόμενη καλλιέργεια για τις μειονεκτικές ορεινές περιοχές. Ωστόσο, στην εγχώρια και διεθνή βιβλιογραφία τα δεδομένα σχετικά με το είδος αυτό είναι περιορισμένα και σε πολλά θέματα (ελληνικό γενετικό δυναμικό, νωπά καρύδια) είναι ελλιπή. Έτσι στα επιμέρους κεφάλαια της παρούσας διατριβής εξετάζονται θέματα που θα μπορέσουν να συμβάλλουν είτε στην καλλιέργεια, είτε στην εξέλιξη της έρευνας που αφορά την καρυδιά.

#### IV. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- Albert, C.M., Willett, W.C., Manson, J.E., Hennekens, C.H.,** 1998. Nut consumption and the risk of sudden and total cardiac death in the Physician's Health Study. *Circulation* **98** (Suppl. 1), I-582.
- Almario, R.U., Vonghavaravat, V., Wong, R., Kasim-Karakas, S.E.,** 2001. Effects of walnut consumption on plasma fatty acids and lipoproteins in combined hyperlipidemia. *The American Journal of Clinical Nutrition* **74**, 72-79.
- Amaral, J.S., Casal, S., Pereira, J.A., Seabra, R.M., Oliveira, B.P.P.,** 2003. Determination of sterol and fatty acid compositions, oxidative stability, and nutritional value of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars grown in Portugal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 7698-7702.
- Anderson, K.J., Teuber, S.S., Gobeille, A., Cremin, P., Waterhouse, A.L., Steinberg, F.M.,** 2001. Walnut polyphenolics inhibit *in vitro* human plasma and LDL oxidation. *The Journal of Nutrition* **131**, 2837-2842.
- Blomhoff, R., Carlsen, M.H., Andersen, L.F., Jacobs, D.R.,** 2006. Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. *British Journal of Nutrition* **96**, S52-S60.
- Carvalho, M., Ferreira, P.J., Mendes, V.S., Silva, R., Pereira, J.A., Jerónimo, C., Silva, B.M.,** 2010. Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food and Chemical Toxicology* **48**, 441-447.
- Davis, L., Stonehouse, W., Loots, D.T., Mukuddem-Petersen, J., van der Westhuizen, F., Hanekom, S.J., Jerling, J.C.,** 2007. The effects of high walnut and cashew nut diets on the antioxidant status of subjects with metabolic syndrome. *European Journal of Nutrition* **46**, 155-164.
- FAOSTAT,** 2008. FAOSTAT Trade Database Results. <http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx>.
- FAOSTAT,** 2009. FAOSTAT Crop Production Database Results. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>.
- Feldman, E.B.,** 2002. The scientific evidence for a beneficial health relationship between walnuts and coronary heart disease. *The Journal of Nutrition* **132**, 1062S-1101S.
- Fraser, G.E., Sabate, J., Beeson, W.L., Strahan, T.M.,** 1992. A possible protective effect of nut consumption on risk of coronary heart disease: the adventist health study. *Archives of Internal Medicine* **152**, 1416-1424.
- Fukuda, T., Ito, H., Yoshida, T.,** 2003. Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.). *Phytochemistry* **63**, 795-801.

- Fukuda, T., Ito, H., Yoshida, T., 2004.** Effect of the walnut polyphenol fraction on oxidative stress in type 2 diabetes mice. *BioFactors* **21**, 251-253.
- Gillen, L.J., Tapsell, L.C., Patch, C.S., Owen, A., Batterham, M., 2005.** Structured dietary advice incorporating walnuts achieves optimal fat and energy balance in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of the American Dietetic Association* **105**, 1087-1096.
- Halvorsen, B.L., Holte, K., Myhrstad, M.C.W., Barikmo, I., Hvattum, E., Remberg, S.F., Wold, A.-B., Haffner, K., Baugerød, H., Andersen, L.F., Moskaug, Û., Jacobs, D.R., Blomhoff, R., 2002.** A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *The Journal of Nutrition* **132**, 461-471.
- Hu, F.B., Stampfer, M.J., Manson, J.E., Rimm, E.B., Colditz, G.A., Rosner, B.A., Speizer, F.E., Hennekens, C.H., Willett, W.C., 1998.** Frequent nut consumption and risk of coronary heart disease in women: prospective cohort study. *British Medical Journal* **317**, 1341-1345.
- Iwamoto, M., Sato, M., Kono, M., Hirooka, Y., Sakai, K., Takeshita, A., Imaizumi, K., 2000.** Walnuts lower serum cholesterol in Japanese men and women. *The Journal of Nutrition* **130**, 171-176.
- Kris-Etherton, P., Taylor, D.S., Yu-Poth, S., Huth, P., Moriarty, K., Fishell, V., Hargrove, R.L., Zhao, G., Etherton, T.D., 2000.** Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *The American Journal of Clinical Nutrition* **71**, 179S-188S.
- Li, L., Tsao, R., Yang, R., Kramer, J.K.G., Hernandez, M., 2007.** Fatty acid profiles, tocopherol contents, and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* var. *cordiformis*) and persian walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 1164-1169.
- Li, L., Tsao, R., Yang, R., Liu, C., Zhu, H., Young, J.C., 2006.** Polyphenolic profiles and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* var. *cordiformis*) and persian walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 8033-8040.
- Medeiros, D.M., 2000.** Olive oil and health benefits. In: Wildman, R. (Ed.), *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. CRC Press, London, UK, pp. 261-267.
- Morgan, J.M., Horton, K., Reese, D., Carey, C., Walker, K., Capuzzi, D.M., 2002.** Effects of walnut consumption as part of a low fat, low-cholesterol diet on serum cardiovascular risk factors. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* **72**, 341-347.
- Papoutsis, Z., Kassi, E., Chinou, I., Halabalaki, M., Skaltsounis, L.A., Moutsatsou, P., 2008.** Walnut extract (*Juglans regia* L.) and its component ellagic acid exhibit anti-inflammatory activity in human aorta endothelial cells and osteoblastic activity in the cell line KS483. *British Journal of Nutrition* **99**, 715-722.

- Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L.,** 2008. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology* **46**, 2103-2111.
- Ποντίκης, Κ.,** 2000. Ειδική Δενδροκομία , Τόμος Δεύτερος, Ακρόδρυα – Πυρηνόκαρπα – Λοιπά Καρποφόρα. *Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα-Πειραιας, Ελλάδα, σελ.* 103-104.
- Prineas, R.J., Kushi, L.H., Folsom, A.R., Bostick, R.M., Wu, Y.,** 1993. Walnuts and serum lipids. *The New England Journal of Medicine* **329**, 359-360.
- Ros, E., Mataix, J.,** 2006. Fatty acid composition of nuts - implications for cardiovascular health. *British Journal of Nutrition* **96**, S29-S35.
- Ros, E., Nunez, I., Perez-Heras, A., Serra, M., Gilabert, R., Casals, E., Deulofeu, R.,** 2004. A Walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects: a randomized crossover trial. *Circulation* **109**, 1609-1614.
- Sabate, J., Fraser, G.E., Burke, K., Knutsen, S.F., Bennett, H., Lindsted, K.D.,** 1993. Effects of walnuts on serum lipid levels and blood pressure in normal men. *The New England Journal of Medicine* **328**, 603-607.
- Tapsell, L.C., Gillen, L.J., Patch, C.S., Batterham, M., Owen, A., Baré, M., Kennedy, M.,** 2004. Including walnuts in a low-fat/modified-fat diet improves HDL cholesterol-to-total cholesterol ratios in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **27**, 2777-2783.
- Zambón, D., Sabaté, J., Muñoz, S., Campero, B., Casals, E., Merlos, M., Laguna, J.C., Ros, E.,** 2000. Substituting walnuts for monounsaturated fat improves the serum lipid profile of hypercholesterolemic men and women. *Annals of Internal Medicine* **132**, 538-546.
- Zibaenezhad, M.J., Rezaiezhadeh, M., Mowla, A., Ayatollahi, S.M.T., Panjehshahin, M.R.,** 2003. Antihypertriglyceridemic effect of walnut oil. *Angiology* **54**, 411-414.
- Zibaenezhad, M.J., Shamsnia, S.J., Khorasani, M.,** 2005. Walnut consumption in hyperlipidemic patients. *Angiology* **56**, 581-583.

# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**

---

*Μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας και των γενετικών σχέσεων ποικιλιών και ελληνικών τοπικών πληθυσμών καρυδιάς (*Juglans regia* L.) με τη χρήση ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) δεικτών*





## Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερη σημασία δίνεται στη μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας πολλών καλλιεργούμενων ειδών με σκοπό να γίνουν κατάλληλες ενέργειες ώστε η παραλλακτικότητα τους να διατηρηθεί ή και να διευρυνθεί μέσα από προγράμματα βελτίωσης. Η παραγωγική καλλιέργεια της καρυδιάς (*Juglans regia* L.) παγκοσμίως βασίζεται στην καλλιέργεια είτε τοπικών ποικιλιών-πληθυσμών, είτε ευρέως διαδεδομένων ποικιλιών που έχουν προέλθει από τα προγράμματα βελτίωσης της Γαλλίας και της Καλιφόρνιας. Καθώς η Ελλάδα είναι από τις πρώτες γεωγραφικές περιοχές της Ευρώπης όπου καλλιεργήθηκε η καρυδιά, μπορεί να θεωρηθεί ότι το γενετικό υλικό που έχει αναπτυχθεί στον Ελλαδικό χώρο χαρακτηρίζεται από μεγάλη παραλλακτικότητα. Έτσι στο παρόν κεφάλαιο εξετάζεται η γενετική παραλλακτικότητα και οι γενετικές σχέσεις μεταξύ διεθνώς καλλιεργούμενων ποικιλιών και ελληνικών τοπικών πληθυσμών καρυδιάς με τη χρήση ISSR (Inter Simple Sequence Repeat -Ενδο-μικροδορυφορικές επαναλήψεις) δεικτών.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε η ύπαρξη υψηλής γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ των 56 εξεταζόμενων γονοτύπων καθώς οι συντελεστές ομοιότητας τους, εκτιμούμενοι κατά Jaccard, ήταν αρκετά χαμηλοί. Ο μέσος συντελεστής ομοιότητας των διεθνών ποικιλιών ήταν υψηλότερος από το μέσο συντελεστή ομοιότητας των ελληνικών επιλογών. Στο δενδρόγραμμα που προέκυψε με βάση τον αλγόριθμο UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), οι περισσότερες διεθνείς ποικιλίες μπόρεσαν να ομαδοποιηθούν καθιστώντας ένα σύνολο, σε αντίθεση με τις ελληνικές επιλογές οι οποίες δεν μπορούν να θεωρηθούν σαν ένα ομοιογενές σύνολο. Στην ομάδα των διεθνών ποικιλιών διακρίθηκαν δύο υποομάδες, όπου στη μια συμμετέχουν κυρίως ποικιλίες που έχουν την 'Payne' στη γενεαλογία τους, ενώ στη δεύτερη συμμετέχουν ποικιλίες που έχουν την 'Franquette' στη γενεαλογία τους ή είναι γαλλικές επιλογές. Εξετάζοντας τους λοιπούς γονότυπους, με βάση τη γενεαλογία τους ή την περιοχή συλλογής τους, δεν διακρίνονται ομοιογενείς ομάδες παρά μόνο ζεύγη γονότυπων με σχετικά υψηλό συντελεστή ομοιότητας. Η ανάλυση της μοριακής διασποράς (AMOVA) αποκάλυψε ότι το μεγαλύτερο μέρος της γενετικής παραλλακτικότητας των ελληνικών επιλογών βρίσκεται εντός της γεωγραφικής περιοχής καλλιέργειας τους, παρά μεταξύ των περιοχών. Ωστόσο εξετάζοντας τις PhiPT τιμές μεταξύ των γεωγραφικών περιοχών φαίνεται ότι όσο πιο απομακρυσμένες είναι μεταξύ τους δύο περιοχές τόσο περισσότερο διαφέρουν γενετικά οι επιλογές καρυδιάς που συλλέχθηκαν σε αυτές.

Συμπερασματικά η εφαρμογή των δεικτών ISSR αποδείχθηκε ικανοποιητική στη μελέτη του ελληνικού γενετικού υλικού καρυδιάς, ενώ η μεγάλη γενετική παραλλακτικότητα του ελληνικού υλικού που αποκαλύφθηκε, σε συνδυασμό με την υψηλή παραλλακτικότητα

που υπάρχει εντός των γεωγραφικών διαμερισμάτων, καθιστά επιβεβλημένη την προστασία και διατήρησή του.

### **1.1.1. Καταγωγή, εξάπλωση και καλλιέργεια της καρυδιάς**

Το γένος *Juglans* περιλαμβάνει 21 είδη (Manning, 1978) από τα οποία η Περσική καρυδιά (*Juglans regia* L.), αποτελεί το πιο σημαντικό καλλιεργούμενο είδος παγκοσμίως (Dandekar et al., 2005). Η κεντρική Ασία θεωρείται ο πιθανότερος τόπος όπου η καρυδιά εξημερώθηκε (Dandekar et al., 2005) και η διάδοση της στην Ευρωπαϊκή ήπειρο έγινε αρχικά από τους αρχαίους Έλληνες και έπειτα από τους Ρωμαίους (Manchester, 1989; Leslie and McGranahan, 1998). Στη Νότιο Αμερική η Περσική καρυδιά μεταφέρθηκε και ξεκίνησε να καλλιεργείται από τους Ισπανούς άποικους το 18<sup>ο</sup> αιώνα, ενώ στη Βόρειο Αμερική το 19<sup>ο</sup> αιώνα εισήχθησαν γονότυποι καρυδιάς από την Γαλλία και την Κίνα (Beede and Hasey, 1998; Tukele and McGranahan, 1994).

Η εξέλιξη των τεχνικών εμβολιασμού της καρυδιάς επέτρεψε την πραγματοποίηση των πρώτων βελτιωτικών προγραμμάτων, αρχικά στη Γαλλία και αργότερα στην Καλιφόρνια από τα οποία προήλθαν οι πλέον διαδεδομένες ποικιλίες καρυδιάς (Dandekar et al., 2005). Παγκοσμίως η παραγωγή καρυδιών βασίζεται στην καλλιέργεια είτε των ποικιλιών που έχουν προέλθει από τα παραπάνω προγράμματα βελτίωσης, είτε τοπικών ποικιλιών -πληθυσμών. Ως τοπική ποικιλία (landrace) μπορεί να οριστεί ένας δυναμικός πληθυσμός καλλιεργούμενων φυτών, που έχει ιστορική προέλευση, διακριτική ταυτότητα, δεν του έχει ασκηθεί καμιά επίσημη βελτιωτική διαδικασία, συχνά παραλλάσει γενετικά και είναι προσαρμοσμένος στις τοπικές συνθήκες και στενά συνδεδεμένος με τα παραδοσιακά συστήματα καλλιέργειας (Camacho Villa et al., 2005).

### **1.1.2. Γενετική παραλλακτικότητα καρυδιάς**

Τα τελευταία χρόνια δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στη μελέτη του γενετικού υλικού της καρυδιάς με βάση είτε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, ή βιοχημικά, ή μοριακούς δείκτες. Οι πρώτες έρευνες που έγιναν με βάση τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά έχουν αποκαλύψει την ύπαρξη υψηλής παραλλακτικότητας της καρυδιάς σε διάφορες περιοχές καλλιέργειας. Οι (Sharma and Sharma, 2001) κατά τη μελέτη 229 γονότυπων καρυδιάς από τέσσερις περιοχές της Ινδίας, με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά, τις κατέταξαν σε 16 ομάδες στις οποίες συμμετείχαν γονότυποι από όλες τις περιοχές, ενώ παράλληλα βρήκαν ότι υπάρχει υψηλή παραλλακτικότητα τόσο μεταξύ των ομάδων όσο και εντός αυτών. Σε παρόμοιες μελέτες υψηλή παραλλακτικότητα βρέθηκε, μεταξύ 840 γονότυπων από τη Σλοβενία (Solar et al., 2002), μεταξύ 65 γονότυπων από την Αλβανία (Zeneli et al., 2005), όπως επίσης μεταξύ γονότυπων από τέσσερις πληθυσμούς της Ισπανίας όπου μάλιστα η παραλλακτικότητα κατανεμήθηκε κυρίως εντός παρά μεταξύ των πληθυσμών (Diaz et al., 2005).

Σε μελέτη, με την ανάλυση αλλοενζύμων, 29 πληθυσμών καρυδιάς από την Ευρώπη, τον Καύκασο και την Κίνα βρέθηκε υψηλή παραλλακτικότητα η οποία μάλιστα ήταν υψηλότερη στους πληθυσμούς της Ελλάδας, της Ιταλίας και της Ουγγαρίας (Fornari et al., 1999). Η μελέτη 8 ποικιλιών καρυδιάς με τη μέθοδο των ισοενζύμων αποκάλυψε σχετικά στενές γενετικές σχέσεις μεταξύ τους καθώς οι συντελεστές ομοιότητας κατά Jaccard ήταν μεταξύ 0,54 και 0,94 (Vyas et al., 2003).

### ***1.1.3. Μοριακοί δείκτες στη μελέτη γονότυπων καρυδιάς***

Η επίδραση του περιβάλλοντος και οι ουδέτερες μεταλλάξεις που μπορεί να συμβούν σε ένα είδος, αποτελούν περιοριστικούς παράγοντες για τη χρήση φαινοτυπικών και βιοχημικών μεθόδων στη μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας. Έτσι η ανάλυση με τη χρήση ουδέτερων δεικτών, όπως οι μοριακοί, μπορεί να δώσει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τη γενετική παραλλακτικότητα και το επίπεδο των εξελικτικών αλλαγών εντός και μεταξύ πληθυσμών.

Αρκετά είδη μοριακών δεικτών έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην καρυδιά με σκοπό την ταυτοποίηση ποικιλιών, τη μελέτη των γενετικών σχέσεων και την παραλλακτικότητα μεταξύ γονότυπων. Με τη χρήση των δεικτών RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA - τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA) διαχωρίστηκαν με επιτυχία 19 ποικιλίες καρυδιάς. Η μελέτη των γενετικών τους σχέσεων τις διαχώρισε σε δύο ομάδες που υποστηρίζονταν σε γενικές γραμμές από τις γενεαλογίες, ωστόσο σημειώθηκαν και κάποιες αποκλίσεις από αυτές (Nicese et al., 1998). Οι Erturk et al. (2011), μελέτησαν τις γενετικές σχέσεις μεταξύ 8 γονότυπων καρυδιάς με τη χρήση δεικτών RAPD. Οι ίδιοι ερευνητές βρήκαν την ύπαρξη υψηλής γενετικής ομοιότητας μεταξύ των γονότυπων, ωστόσο, παρατήρησαν ότι σε ορισμένες περιπτώσεις οι συντελεστές ομοιότητας μεταξύ γονέων και απογόνων ήταν χαμηλότεροι από τους συντελεστές ομοιότητας μεταξύ γονότυπων που δεν συνδέονταν από γνωστή γενεαλογία.

Υψηλή παραλλακτικότητα αναφέρεται κατά την μελέτη 21 γονότυπων καρυδιάς από την Τουρκία με τη χρήση δεικτών AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism- Πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων) και δεικτών SAMPL (Selective Amplification Microsatellite Polymorphic Loci) (Kafkas et al., 2005). Οι δείκτες αυτοί διαχώρισαν με επιτυχία τους γονότυπους και τους ομαδοποίησαν, με ορισμένες εξαιρέσεις, με βάση τις περιοχές καλλιέργειας τους. Κατά την AFLP μελέτη 22 τουρκικών γονότυπων, χαμηλών απαιτήσεων σε ψύχος, βρέθηκαν αρκετά υψηλοί συντελεστές γενετικής ομοιότητας (0,895-0,996) και διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες χωρίς όμως να διευκρινίζεται η σημασία τους (Bayazit et al., 2007). Η μελέτη 50 γονότυπων καρυδιάς (16 υβρίδια και 34 σπορόφυτα από ελεύθερη επικονίαση) από την Κίνα με τη χρήση AFLP αποκάλυψε την ύπαρξη μέτριας

γενετικής παραλλακτικότητας κατηγοριοποιώντας το υλικό σε 5 ομάδες (Ma et al., 2011). Στην παραπάνω μελέτη παρατηρήθηκε ότι μόνο σε ορισμένες από τις ομάδες οι γονότυποι υποστήριζαν τη γενεαλογία ή/και τη γεωγραφική τους καταγωγή.

Κατά την ανάπτυξη των δεικτών SSR (Simple Sequence Repeats) στη μελέτη 47 επιλογών και ποικιλιών καρυδιάς από τη συλλογή της Καλιφόρνια έγινε ικανοποιητικός διαχωρισμός των γονότυπων και επιβεβαιώθηκαν ορισμένες γενεαλογίες (Dangl et al., 2005). Οι ίδιοι δείκτες χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία στην ταυτοποίηση των ιταλικών καρυδιών 'Sorrento', υποδεικνύοντας παράλληλα υψηλή παραλλακτικότητα μεταξύ τους, όπως επίσης και τον πιθανό γενετικό εμπλουτισμό τους από εμπορικές ποικιλίες (Foroni et al., 2005; Foroni et al., 2007). Επίσης σε μελέτη γονότυπων καρυδιάς από τη Νότιο-δυτική Κίνα με SSR αποκαλύφθηκε υψηλή παραλλακτικότητα, η οποία κατανεμήθηκε κυρίως εντός των πέντε πληθυσμών που εξετάστηκαν παρά μεταξύ τους (Wang et al., 2008). Η μελέτη 57 γονότυπων καρυδιάς, προερχόμενοι κυρίως από την Ισπανία και τις ΗΠΑ, με δείκτες SSR διαχώρισε το υλικό με βάση τη γεωγραφική του καταγωγή (Ruiz-Garcia et al., 2011). Οι Ebrahimi et al. (2011), μελέτησαν με δείκτες SSR γονότυπους καρυδιάς από τους οποίους 31 προέρχονταν από το Ιράν και 4 ήταν διεθνείς ποικιλίες. Οι παραπάνω ερευνητές αναφέρουν την ύπαρξη υψηλής παραλλακτικότητας εντός του Ιρανικού υλικού καρυδιάς, ενώ ορισμένες στενές σχέσεις μεταξύ γονότυπων από το Ιράν και διεθνών ποικιλιών τις απέδωσαν στην πιθανότητα το Ιράν να αποτελεί κέντρο καταγωγής της καρυδιάς. Σε παρόμοια έρευνα με SSRs μελετώντας 105 Ιρανικούς γονότυπους από 7 πληθυσμούς καρυδιάς βρέθηκε υψηλή παραλλακτικότητα του υλικού η οποία κατανεμήθηκε κυρίως εντός των πληθυσμών και δευτερευόντως μεταξύ αυτών (Kamiri et al., 2010).

Στην πρώτη μελέτη γενετικού υλικού της καρυδιάς που έγινε με την χρήση δεικτών ISSR (Inter-simple sequence repeats), ταυτοποιήθηκαν με επιτυχία 48 ποικιλίες και προσδιορίστηκαν οι γενετικές τους σχέσεις (Potter et al., 2002). Στη μελέτη αυτή δεν υπήρξε κάποια ξεκάθαρη ομαδοποίηση των γονότυπων, ωστόσο διακρίθηκαν ορισμένοι κλάδοι στο δενδρόγραμμα που περιελάμβαναν ποικιλίες ίδιας προέλευσης ή που σχετίζονταν με βάση τη γενεαλογία τους. Οι Pollegioni et al. (2003), μελετώντας 4 Ιταλικές ποικιλίες καρυδιάς με ISSRs παρατήρησαν ομαδοποίηση των γονότυπων με βάση τη γεωγραφική θέση καλλιέργειάς τους.

Από τα είδη των μοριακών δεικτών, που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της καρυδιάς, το κάθε είδος δείκτη έχει κάποια πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα. Οι RAPDs είναι χαμηλού κόστους αλλά έχουν μικρή επαναληψιμότητα και δεν ενισχύουν μεγάλο αριθμό ζωνών. Οι AFLPs ενισχύουν μεγάλο αριθμό ζωνών και δίνουν υψηλό πολυμορφισμό αλλά είναι υψηλού κόστους. Οι SSRs είναι εξαιρετικά χρήσιμοι στη ταυτοποίηση ποικιλιών, την εκτίμηση γενεαλογιών και την μελέτη της γενετικής

παραλλακτικότητας, αλλά απαιτούν την ανάπτυξη εξειδικευμένων εκκινητών για ένα είδος (Zhang et al., 2010). Οι ISSRs είναι μικρού κόστους, δίνουν αρκετά μεγάλο πολυμορφισμό και αριθμό ζωνών και είναι κατάλληλοι για μελέτες που αφορούν τη γενετική παραλλακτικότητα (Reddy et al., 2002)

#### **1.1.4. Σκοπός κεφαλαίου**

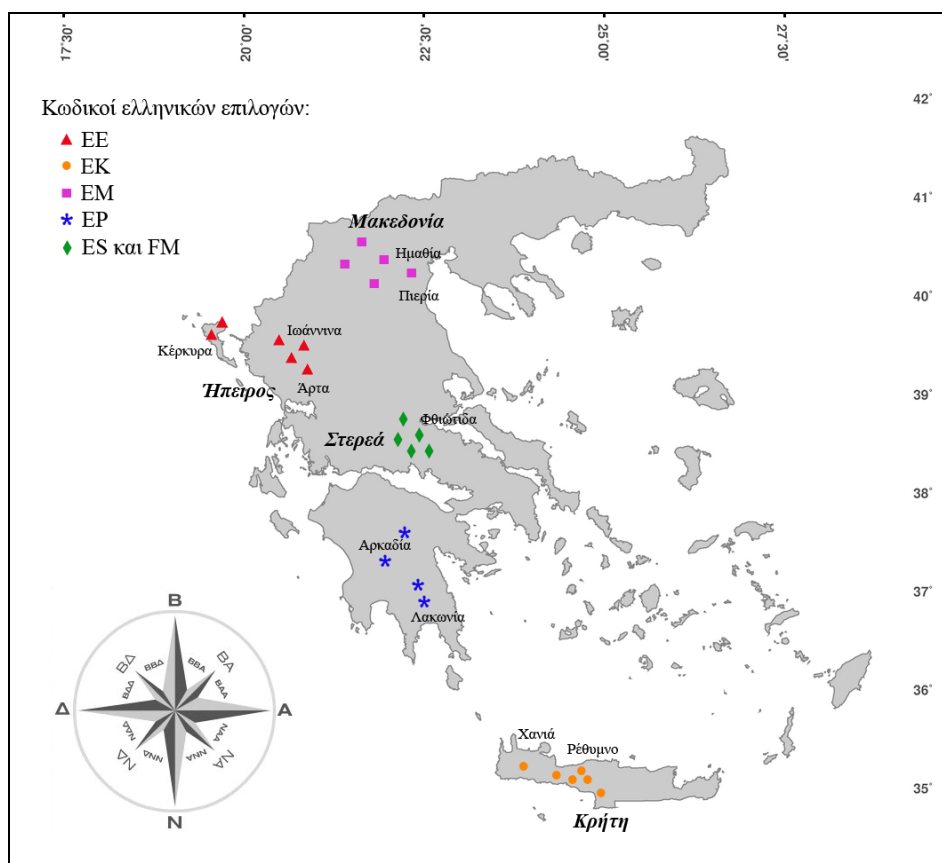
Στην Ελλάδα η παραγωγή καρυδιών βασίζεται κυρίως στην παραδοσιακή καλλιέργεια τοπικών ποικιλιών-πληθυσμών καρυδιάς οι οποίοι έχουν προσαρμοστεί καλά στις τοπικές κλιματικές συνθήκες (Germain et al., 1997). Καθώς ο Ελλαδικός χώρος είναι από τις πρώτες περιοχές που καλλιεργήθηκε η καρυδιά, μπορεί να θεωρηθεί ότι οι τοπικοί ελληνικοί πληθυσμοί χαρακτηρίζονται από μεγάλη παραλλακτικότητα. Στο Σταθμό Γεωργικής Έρευνας Βαρδατών του ΕΘΙΑΓΕ έχει δημιουργηθεί μια συλλογή που περιλαμβάνει διεθνώς καλλιεργούμενες ποικιλίες και επιλογές από ελληνικούς τοπικούς πληθυσμούς καρυδιάς, με σκοπό να εκτιμηθεί, κάτω υπό τις ίδιες κλιματολογικές συνθήκες, το ελληνικό γενετικό υλικό και έχει ξεκινήσει ένα πρόγραμμα βελτίωσης. Κάποιες επιλογές και υβρίδια έχουν επιδείξει εξαιρετικά χαρακτηριστικά (Germain et al., 1997; Rouskas et al., 1997; Rouskas and Zakynthinos, 2001), γεγονός που υποδηλώνει μια δυναμική του ελληνικού γενετικού αποθέματος.

Ωστόσο, η διερεύνηση της γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ των ελληνικών τοπικών πληθυσμών καρυδιάς και οι σχέσεις τους με τις διεθνώς καλλιεργούμενες ποικιλίες, καθίσταται επιτακτική, ώστε να διατηρηθεί η παραλλακτικότητα αυτή και ταυτόχρονα να αξιοποιηθούν ή να εξελιχθούν τα βελτιωτικά προγράμματα της καρυδιάς. Έτσι ο βασικός σκοπός του παρόντος κεφαλαίου αποτελεί η εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας του ελληνικού γενετικού υλικού. Το υλικό αυτό δεν έχει μελετηθεί με ουδέτερους δείκτες, για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν οι μοριακοί δείκτες ISSR, ώστε να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητά τους στη μελέτη των ελληνικών γονότυπων. Παράλληλα εξετάζονται οι γενετικές σχέσεις μεταξύ ελληνικών γονότυπων και διεθνών ποικιλιών, η παραλλακτικότητα που υπάρχει μεταξύ και εντός των ελληνικών περιοχών καλλιέργειας και η πιθανή συσχέτιση μοριακών και μορφολογικών χαρακτηριστικών.

## 1.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1.2.1. Φυτικό υλικό

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε αποτελούνταν από ενήλικα δένδρα 56 γονοτύπων καρυδιάς, καλλιεργούμενων στον Σταθμό Γεωργικής Έρευνας Βαρδατών (ΕΘΙΑΓΕ Βαρδατών) και περιελάμβανε επιλογές από ιθαγενείς ελληνικούς πληθυσμούς, διεθνείς ποικιλίες και διασταυρώσεις μεταξύ των γονοτύπων. Οι ελληνικές επιλογές αποτελούνταν από γονότυπους που συλλέχθηκαν από πέντε γεωγραφικά διαμερίσματα (Εικόνα 1.1), εμβολιάστηκαν και καλλιεργήθηκαν *ex situ* στο ΕΘΙΑΓΕ Βαρδατών (φ:38°49'37"Β, λ:22°26'10"Α, υψόμετρο 12 m). Κάθε επιλογή κωδικοποιήθηκε με ένα πρόθεμα χαρακτηριστικό για το γεωγραφικό διαμέρισμα από όπου συλλέχθηκε (ΕΕ: Ήπειρος-Κέρκυρα, ΕΚ: Κρήτη, ΕΜ: Μακεδονία, ΕΡ: Πελοπόννησος και ΕΣ, FM, ΕΑΑ: Στερεά).



Εικόνα 1. 1. Περιοχές συλλογής των ελληνικών επιλογών καρυδιάς που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη.

Οι επιλογές ΕΕ27/Β, ΕΕ28/Β, ΕΕ30/Β και ΕΡ13/Α ήταν αυτόχθονα δένδρα, ενώ οι υπόλοιπες ήταν εξημερωμένα δένδρα που είχαν προέλθει από σπόρους αυτοχθόνων. Το φυτικό υλικό που παράχθηκε στο ΕΘΙΑΓΕ Βαρδατών περιελάμβανε τους γονότυπους 'Bigtop', 'CH2/3', 'Πλαγιόκαρπη Hartley' και 'Λητώ' που προήλθαν από ελεγχόμενες διασταυρώσεις, όπου και οι δύο γονείς είναι γνωστοί, ενώ οι γονότυποι CH3/4, ΕΑΑ26/Α,



‘Ηλιάνα’ και ‘Ιόλη’ προήλθαν από διασταυρώσεις όπου ο αρσενικός γονέας είναι άγνωστος. Η προέλευση και η γενεαλογία των γονότυπων καρυδιάς που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.1.

**Πίνακας 1. 1.** Γενετικό υλικό καρυδιάς, προέλευση, καταγωγή και γενεαλογία

Όνομα γονότυπου	Χώρα προέλευσης	Περιοχή πρώτης καλλιέργειας	Γενεαλογία
EE25/B	Ελλάδα	Ιωάννινα	Τοπική επιλογή
EE27/B	Ελλάδα	Άρτα	Τοπική επιλογή
EE28/B	Ελλάδα	Ιωάννινα	Τοπική επιλογή
EE30/B	Ελλάδα	Κέρκυρα	Τοπική επιλογή
EE34/A	Ελλάδα	Ιωάννινα	Τοπική επιλογή
EE39/B	Ελλάδα	Κέρκυρα	Τοπική επιλογή
EK1/A	Ελλάδα	Χανιά	Τοπική επιλογή
EK2/A	Ελλάδα	Ρέθυμνο	Τοπική επιλογή
EK2/B	Ελλάδα	Ρέθυμνο	Τοπική επιλογή
EK3/B	Ελλάδα	Ρέθυμνο	Τοπική επιλογή
EK4/A	Ελλάδα	Ρέθυμνο	Τοπική επιλογή
EK5/A	Ελλάδα	Ρέθυμνο	Τοπική επιλογή
EM34/B	Ελλάδα	Μακεδονία	Τοπική επιλογή
EM35/B	Ελλάδα	Μακεδονία	Τοπική επιλογή
EM36/B	Ελλάδα	Μακεδονία	Τοπική επιλογή
EM37/B	Ελλάδα	Ημαθία	Τοπική επιλογή
EM39/B	Ελλάδα	Πιερία	Τοπική επιλογή
EP6/A	Ελλάδα	Λακωνία	Τοπική επιλογή
EP13/A	Ελλάδα	Αρκαδία	Τοπική επιλογή
EP20/A	Ελλάδα	Λακωνία	Τοπική επιλογή
EP42/B	Ελλάδα	Πελοπόννησος	Τοπική επιλογή
ES22/A	Ελλάδα	Φθιώτιδα	Τοπική επιλογή
ES25/A	Ελλάδα	Ευρυτανία	Τοπική επιλογή
ES26/A	Ελλάδα	Φθιώτιδα	Τοπική επιλογή
ES28/A	Ελλάδα	Φθιώτιδα	Τοπική επιλογή
FM3	Ελλάδα	Φθιώτιδα	Τοπική επιλογή
FM6	Ελλάδα	Φθιώτιδα	Τοπική επιλογή
‘Amigo’	ΗΠΑ	Καλιφόρνια	Sharkey × Marchetti
‘Ashley’	ΗΠΑ	Καλιφόρνια	Σπορόφυτο από Payne
‘Chandler’	ΗΠΑ	Καλιφόρνια	Pedro × UC 56-224
‘Gustine’	ΗΠΑ	Καλιφόρνια	Waterloo × Payne
‘Hartley’	ΗΠΑ	Καλιφόρνια	Franquette × Mayette
‘Midland’	ΗΠΑ	Καλιφόρνια	Franquette × Payne
‘Pedro’	ΗΠΑ	Καλιφόρνια	C. Mayette × Payne
‘Serr’	ΗΠΑ	Καλιφόρνια	Payne × PI 159568

**Πίνακας 1. 1.** Γενετικό υλικό καρυδιάς, προέλευση, καταγωγή και γενεαλογία

Όνομα γονότυπου	Χώρα προέλευσης	Περιοχή πρώτης καλλιέργειας	Γενεαλογία
‘Spurgeon’	ΗΠΑ	Oregon	Τοπική επιλογή
‘Vina’	ΗΠΑ	Καλιφόρνια	Franquette × Payne
‘Franquette’	Γαλλία	Isère	Τοπική επιλογή
‘Fernette’	Γαλλία	Bordeaux	Franquette × Lara
‘Fernor’	Γαλλία	Bordeaux	Franquette × Lara
‘Grand jean’	Γαλλία	Dordogne	Τοπική επιλογή
‘Grosvert’	Γαλλία	Sarladais	Τοπική επιλογή
‘Lara’	Γαλλία	Gironde	Σπορόφυτο από Payne
‘Marbot’	Γαλλία	Corrèze	Τοπική επιλογή
‘Meylannaise’	Γαλλία	Grenoble	Τοπική επιλογή
‘Parisienne’	Γαλλία	Vinay- Isère	Τοπική επιλογή
‘Ronde du Montignac’	Γαλλία	Dordogne	Τοπική επιλογή
‘Sibisel 39’	Ρουμανία	Transylvania	Τοπική επιλογή
‘Bigtop’	Ελλάδα	ΕΘΙΑΓΕ	Chandler × FM3
CH 2/3	Ελλάδα	ΕΘΙΑΓΕ	Chandler × FOKA1
CH 3/4	Ελλάδα	ΕΘΙΑΓΕ	Σπορόφυτο από Chandler
EAA26/A	Ελλάδα	ΕΘΙΑΓΕ	Σπορόφυτο από Ioli
‘Ηλιάνα’	Ελλάδα	ΕΘΙΑΓΕ	Σπορόφυτο από Gustine
‘Ιόλη’	Ελλάδα	ΕΘΙΑΓΕ	Σπορόφυτο από EAA6
‘Πλαγιόκαρπη Hartley’	Ελλάδα	ΕΘΙΑΓΕ	Hartley × Gustine
‘Λητώ’	Ελλάδα	ΕΘΙΑΓΕ	Pedro × Gustine

### 1.2.2. Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που εξετάστηκαν ήταν ο τύπος ανάπτυξης της κόμης, ο τρόπος καρποφορίας, η ζωνρότητα, η έναρξη της βλάστησης, το βάρος του καρπού (g), το ποσοστό του σπέρματος (% καρπού) και το χρώμα του σπέρματος (Πίνακας 1.2). Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά είχαν ληφθεί σύμφωνα με τον επίσημο κατάλογο περιγραφικών (descriptors) της καρυδιάς (IPGRI, 1994). Ειδικότερα ο τρόπος καρποφορίας είναι ο περιγραφητής ‘Lateral bud flowering’ όπου αντιστοιχεί στο ‘Ποσοστό (%) πλάγιων βλαστών τρέχουσας βλάστησης με θηλυκά άνθη στα νεαρά δένδρα’, και οι σχετικοί γονότυποι χαρακτηρίστηκαν ως Ακρόκαρποι <30%, Ενδιάμεσοι <60% και Πλαγιόκαρποι >60%. Το χρώμα του σπέρματος καταγράφηκε με οπτική παρατήρηση και εκφράστηκε ως: EX: εξαιρετικά ανοιχτόχρωμο, KI: ανοιχτόχρωμο, KII: ανοικτό καφέ και KIII: καφέ, ενώ δημιουργήθηκαν και τρεις επιπλέον κατηγορίες (EX+KI, KI+KII, KII+KIII) όπου περιελάμβαναν τους ενδιάμεσους χρωματισμούς.

**Πίνακας 1. 2.** Γενετικό υλικό καρυδιάς, χαρακτηριστικά του δένδρου και του καρπού.

Όνομα γονότυπου	Τύπος ανάπ. †	Καρπ. †	Ζωηρότητα †	Έναρξη βλ. †	ΒΚ	Σπέρμα %	Χρώμα σπ. †
EE25/B	Πλαγ †	Ενδ †	Μικρή	Πρ †	20-21	39-41	ΚΙΙ
EE27/B	Ήμι-Ορθ	Ενδ	Μέση	Πρ	14-15	52-53	ΚΙ
EE28/B	Ήμι-Ορθ	Πλ	Μεγάλη	Πολύ Πρ	17-18	46-48	ΚΙ
EE30/B	Ήμι-Ορθ	Ενδ	Μέση	Πρ	15-16	35-37	ΚΙΙ
EE34/A	Ήμι-Ορθ	Ενδ	Μέση	Πρ	16-17	47-48	ΚΙ + ΚΙΙ
EE39/B	Πλαγ	Πλ	Μικρή	Πολύ Πρ	13-14	49-51	ΚΙ + ΚΙΙ
EK1/A	Πλαγ	Πλ	Μικρή	Πρ	16-17	47-49	ΕΧ + ΚΙ
EK2/A	Ήμι-Ορθ	Ενδ	Μικρή	Μέσο-Πρ	15-16	44-47	ΚΙ
EK2/B	Πλαγ	Πλ	Μικρή	Πρ	15-16	49-50	ΚΙ + ΕΧ
EK3/B	Πλαγ	Πλ	Μικρή	Πρ	23-24	46-48	ΚΙΙ
EK4/A	Ήμι-Ορθ	Ακρ	Μέση	Πρ	15-16	54-55	ΚΙ + ΚΙΙ
EK5/A	Ήμι-Ορθ	Ακρ	Μεγάλη	Πολύ Πρ	14-15	47-49	ΚΙ + ΕΧ
EM34/B	Ορθ	Ενδ	Μεγάλη	Μέσο-Πρ	20-21	49-51	ΚΙ
EM35/B	Ορθ	Ενδ	Μεγάλη	Πρ	17-18	45-47	ΚΙΙ
EM36/B	Ορθ	Ενδ	Μεγάλη	Μέσο-Πρ	17-18	41-43	ΚΙ + ΚΙΙ
EM37/B	Ορθ	Ενδ	Μεγάλη	Πρ	17-18	47-49	ΚΙΙ
EM39/B	Ορθ	Ακρ	Μεγάλη	Μέσο-Πρ	14-15	52-53	ΚΙΙΙ
EP6/A	Ορθ	Ακρ	Πολύ μεγάλη	Πολύ Πρ	18-19	46-48	ΚΙ
EP13/A	Πλαγ	Πλ	Μικρή	Πολύ Πρ	13-14	51-52	ΚΙ
EP20/A	Ήμι-Ορθ	Ενδ	Μέση	Πολύ Πρ	12-13	53-55	ΚΙ + ΚΙΙ
EP42/B	Πλαγ	Πλ	Μικρή	Πρ	20-21	53-54	ΚΙ
ES22/A	Ορθ	Ακρ	Πολύ μεγάλη	Πρ	17-18	48-50	ΚΙ + ΚΙΙ
ES25/A	Πλαγ	Πλ	Μικρή	Πρ	17-18	46-48	ΚΙ
ES26/A	Ήμι-Ορθ	Ακρ	Μέση	Πρ	15-16	47-49	ΚΙ
ES28/A	Ήμι-Ορθ	Ακρ	Μεγάλη	Μέσο-Πρ	19-20	46-48	ΕΧ + ΚΙ
FM3	Ήμι-Ορθ	Πλ	Μέση	Μέσο-Πρ	22-25	44-47	ΚΙ + ΚΙΙ
FM6	Ήμι-Ορθ	Ενδ	Μέση	Μέσο-Πρ	21-23	45-47	ΚΙ
‘Amigo’	Πλαγ	Πλ	Μικρή	Πρ	10-12	47-50	ΚΙ + ΚΙΙ
‘Ashley’	Πλαγ	Πλ	Μικρή	Πρ	12-13	47-49	ΚΙ
‘Chandler’	Πλαγ	Πλ	Μικρή	Μέσο-Οψ <sup>b</sup>	11-13	48-52	ΕΧ
‘Gustine’	Πλαγ	Πλ	Μικρή	Πρ	11-12	48-52	ΚΙ
‘Hartley’	Ήμι-Ορθ	Ενδ	Μέση	Μέσο-Οψ	12-13	45-49	ΚΙ
‘Midland’	Πλαγ	Πλ	Μικρή	Μέσο-Πρ	14-15	45-47	ΚΙΙ
‘Pedro’	Πλαγ	Πλ	Μικρή	Μέσο-Οψ	12-13	46-50	ΚΙΙ + ΚΙ
‘Serr’	Ήμι-Ορθ	Πλ	Μεγάλη	Πρ	11-12	52-57	ΚΙ + ΕΧ
‘Spurgeon’	Ήμι-Ορθ	Ακρ	Μικρή	Οψ	14-15	42-45	ΚΙ
‘Vina’	Πλαγ	Πλαγ	Μικρή	Μέσο-Πρ	11-12	47-51	ΚΙΙ + ΚΙ
‘Franquette’	Ήμι-Ορθ	Ακρ	Μεγάλη	Οψ	11-12	43-46	ΕΧ + ΚΙ
‘Fernette’	Ήμι-Ορθ	Πλ	Μέση	Οψ	13-14	46-49	ΕΧ + ΚΙ

**Πίνακας 1. 2.** Γενετικό υλικό καρυδιάς, χαρακτηριστικά του δένδρου και του καρπού.

Όνομα γονότυπου	Τύπος αναπ. †	Καρπ. †	Ζωηρότητα †	Έναρξη βλ. †	BK	Σπέρμα %	Χρώμα σπ. †
‘Fernor’	Ήμι-Ορθ	Πλ	Μέση	Οψ	14-15	44-47	KI
‘Grand jean’	Ορθ	Ακρ	Μέση	Οψ	11-12	48-50	KI
‘Grosvert’	Ήμι-Ορθ	Ακρ	Μέση	Οψ	11-12	46-47	KI
‘Lara’	Ήμι-Ορθ	Πλ	Μικρή	Μέσο-Οψ	13-14	48-52	KI
‘Marbot’	Ορθ	Ακρ	Μεγάλη	Οψ	16-17	41-43	KI + KII
‘Meylannaise’	Ήμι-Ορθ	Ακρ	Μέση	Οψ	10-12	43-47	KII + KI
‘Parisienne’	Ήμι-Ορθ	Ακρ	Μέση	Οψ	14-15	45-47	KI
‘R. du Mont’.	Ήμι-Ορθ	Ακρ	Μικρή	Οψ	10-11	46-50	KII + KI
‘Sibisel 39’	Ήμι-Ορθ	Ακρ	Μέση	Μέσο-Οψ	18-20	45-46	KI
‘Bigtop’	Πλαγ	Πλ	Μικρή	Μέσο-Οψ	18-20	50-52	EX + KI
CH 2/3	Ήμι-Ορθ	Ακρ	Μέση	Μέσο-Οψ	13-14	46-47	EX
CH 3/4	Ήμι-Ορθ	Ενδ	Μέση	Μέσο-Οψ	18-19	47-48	KI
EAA26/A	Ήμι-Ορθ	Πλ	Μέση	Μέσο-Πρ	17-18	47-49	KI
‘Ηλιάνα’	Ήμι-Ορθ	Πλ	Μέση	Μέσο-Πρ	13-14	50-54	KI + EX
‘Ιόλη’	Πλαγ	Πλ	Μικρή	Μέσο-Πρ	15-17	50-52	EX + KI
‘Πλ. Hartley’	Πλαγ	Πλ	Μικρή	Μέσο-Οψ	12-13	46-50	KI
‘Λητώ’	Πλαγ	Πλ	Μικρή	Μέσο-Οψ	12-13	47-50	KI

† Ακρ: ακρόκαρπη, BK: βάρος καρπού; Ενδ: ενδιάμεση, EX: εξαιρετικά ανοιχτόχρωμο, Καρπ: καρποφορία, KI: ανοιχτόχρωμο, KII: ανοικτό καφέ, KIII: καφέ, Ορθ: ορθόκλαδη, Οψ: όψιμη, Πλ: πλαγιόκαρπη, Πλαγ: πλαγιόκλαδη, Πρ: πρόιμη, Τύπος αναπ: τύπος ανάπτυξης, Χρώμα σπ: χρώμα σπέρματος. Τα χαρακτηριστικά καταγράφηκαν σύμφωνα με τον επίσημο κατάλογο περιγραφητών της καρυδιάς της IPGRI και τα παρόντα δεδομένα προήλθαν από την αξιολόγηση του ΕΘΙΑΓΕ. Η καρποφορία αντιστοιχεί στο χαρακτηριστικό: ποσοστό (%) πλάγιων βλαστών τρέχουσας βλάστησης με θηλυκά άνθη στα νεαρά δένδρα, και εκφράστηκε ως: Ακρόκαρπη < 30 %, Ενδιάμεση < 60 %, Πλαγιόκαρπη > 60 %.

Το βάρος του καρπού (g) και το ποσοστό σπέρματος (% καρπού), που ήταν συνεχείς τιμές (continuous data), μετατράπηκαν σε δεδομένα διατεταγμένης κλίμακας (ordinal data) δημιουργώντας διαστήματα εντός του εύρους των συνεχών τιμών, με βάση την τυπική απόκλιση των τιμών αυτών.

### 1.2.3. Απομόνωση γενωμικού DNA

Συλλέχθηκαν νεαρά φύλλα, ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό και αφού στέγνωσαν σε θερμοκρασία δωματίου κατόπιν ψύχθηκαν με εμβάπτιση σε υγρό άζωτο. Στη συνέχεια τα φύλλα αποξηράνθηκαν με λυοφιλίωση και κονιοροποιήθηκαν. Η απομόνωση του DNA έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Saghai-Marooft et al. (1984) με ορισμένες τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα 400 mg ιστού με προσθήκη 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης CTAB [2% CTAB (w/v), 1% PVP (w/v); 0,14 M β-mercaptoethanol; 100 mM NaHSO<sub>3</sub>; 1,2 M NaCl;

100 mM Tris-HCl (pH 8,0); 20 mM Na<sub>2</sub>EDTA (pH 8.0)], επώαστηκαν στους 65°C υπό ελαφριά ανάδευση για 120 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10 ml διαλύματος χλωροφορμίου:οκτανόλης [24:1 (v/v)], ακολούθησε ελαφρά ανάδευση για 10 min, φυγοκέντρηση στα 3200 g για 10 min και συλλογή της υπερκείμενης φάσης, διαδικασία που επαναλήφθηκε δύο φορές. Η κατακρήμνιση του DNA έγινε με προσθήκη 7,5 ml παγωμένης (-20°C) ισοπροπυλικής αλκοόλης, φυγοκέντρηση στα 3200 g για 10 min, απόρριψη της υπερκείμενης φάσης και διάλυση του ιζήματος σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος TE [10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA]. Ακολούθησε καθαρισμός από το RNA με προσθήκη 40 μl RNase (10 mg ml<sup>-1</sup>) και επώαση στους 37° C για 60 min. Για την απόκτηση DNA υψηλότερης καθαρότητας έγινε τρεις φορές εκχύλιση με προσθήκη 1 ml φαινόλης, φυγοκέντρηση στα 3200 g για 10 min και απόρριψη της υπερκείμενης φάσης. Ακολούθησε ένα ακόμα στάδιο εκχύλισης με 1 ml χλωροφορμίου:οκτανόλης [24:1 (v/v)] και η συλλογή του DNA έγινε με υάλινο άγκιστρο ύστερα από την προσθήκη 2,5 ml παγωμένης αιθανόλης και 50 μl NaCl (5 M). Πριν την τελική διάλυση του DNA σε 0,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος TE, προηγήθηκαν δύο στάδια πλύσης σε 2 ml NaOAc (0,2 M σε 76% αιθανόλη) για 20 min και έπειτα σε 2 ml NH<sub>4</sub>OAc (10 mM σε 76% αιθανόλη) για 2 s.

Ο έλεγχος της καθαρότητας του DNA εκτιμήθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση, εφαρμόζοντας τάση 80 V σε πηκτική αγαρόζης [1% (w/v); 1 μg ml<sup>-1</sup> βρωμιούχο αιθίδιο (w/v)] και η παρατήρηση έγινε σε τράπεζα UV ακτινοβολίας (365 nm). Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του DNA έγινε φασματοφωτομετρικά με τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης του δείγματος στα 260 nm, λαμβάνοντας υπόψη το συντελεστή απορρόφησης του DNA ( $A_{260} = 50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ).

#### ***1.2.4. Ενίσχυση DNA, επιλογή εκκινητών και διαχωρισμός προϊόντων***

Για την ενίσχυση του DNA εφαρμόστηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR). Η ενίσχυση πραγματοποιήθηκε σε 25 μl μίγματος αντίδρασης που περιείχε 25 ng DNA, 1× ρυθμιστικό διάλυμα PCR [20 mM Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM KCl], 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM νουκλεοτίδια (dNTPs), 1 U *Taq* DNA πολυμεράση και 1 μM εκκινητή. Η ενίσχυση του DNA έλαβε χώρα σε θερμοκυκλοποιητή PTC 200 (MJ Research, Watertown, MA, USA) χρησιμοποιώντας το ακόλουθο θερμικό πρότυπο: αρχική αποδιάταξη στους 94° C για 5 min, 35 κύκλους με αποδιάταξη στους 94° C για 1 min, υβριδισμό στους 53° C για 1 min, επέκταση στους 72° C για 2 min και ένα τελικό βήμα επέκτασης στους 72° C για 5 min.

Προκαταρκτικά, σε τέσσερα τυχαία δείγματα, 95 εκκινητές ISSR (UBC, Vancouver, BC, Canada) δοκιμάστηκαν για να εκτιμηθεί η ικανότητά τους να ενισχύσουν το DNA και τα ενισχυμένα προϊόντα διαχωρίστηκαν σε πηκτική αγαρόζης [1% (w/v); 1 μg ml<sup>-1</sup> βρωμιούχο

αιθίδιο (w/v)] με τη μεθοδολογία που εφαρμόστηκε για τον έλεγχο της καθαρότητας του DNA σε προηγούμενη παράγραφο (1.2.3.). Από τους εκκινητές που δοκιμάστηκαν επιλέχθηκαν επτά οι οποίοι έδιναν πολυμορφικά, καθαρά και επαναλαμβανόμενα προϊόντα.

Ο διαχωρισμός των ενισχυμένων προϊόντων των 56 γονότυπων έγινε σε πηκτή 6% πολυακρυλαμίδης {acrylamide:*N,N'*-methylenebisacrylamide (30:1); 3 M ουρία; 1 × ρυθμιστικό διάλυμα TBE [90 mM Tris-HCl (pH 8,3); 90 mM Βορικό οξύ; 2 mM EDTA]}, σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης υπό τάση 400 V για 12 h. Ως σταθερά, για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των ενισχυμένων προϊόντων, χρησιμοποιήθηκε η κλίμακα μοριακών βαρών '100 bp DNA ladder' (Invitrogen, Madison, USA).

### **1.2.5. Στατιστική ανάλυση δεδομένων**

Ζώνες με μοριακό βάρος μεταξύ 200 και 1500 bp επισημάνθηκαν και κάθε πολυμορφική ζώνη αξιολογήθηκε ως διμορφικό χαρακτηριστικό με τις τιμές 1 και 0 να υποδηλώνουν την παρουσία ή την απουσία της ζώνης, αντίστοιχα. Έτσι δημιουργήθηκε μια τετραγωνική μήτρα από τα ISSR δεδομένα. Για την εκτίμηση της ικανότητας των εκκινητών να διαχωρίσουν τους 56 γονότυπους καρυδιάς υπολογίστηκαν το περιεχόμενο πληροφορίας πολυμορφισμού (polymorphic information content -PIC), η ένδειξη μοριακών δεικτών (Marker Index-MI) και η αναλυτική δύναμη εκκινητών (resolving power -Rp).

Το PIC υπολογίστηκε κατά τους De Riek et al. (2001), ως:  $PIC=1-[f^2+(1-f)^2]$ , όπου  $f$  είναι η συχνότητα της ζώνης για τον κάθε γενετικό τόπο. Το PIC ενός τόπου για κυρίαρχους μοριακούς δείκτες, όπως οι ISSRs, μπορεί να λάβει ως μέγιστο την τιμή 0,5, ενώ η τιμή PIC ενός εκκινητή υπολογίζεται ως ο μέσος όρος των τιμών PIC των τόπων του. Το MI υπολογίστηκε κατά τους Powell et al. (1996), ως:  $MI=n \times PPB \times H_{av}$ , όπου  $n$  και  $PPB$  είναι ο συνολικός αριθμός και το ποσοστό των πολυμορφικών τόπων για κάθε εκκινητή, αντίστοιχα, ενώ  $H_{av}$  είναι η μέση ετεροζυγωτία των πολυμορφικών τόπων που επισημαίνονται για κάθε εκκινητή. Το Rp υπολογίστηκε κατά τους Prevost and Wilkinson (1999), ως:  $Rp=\Sigma I_b$ , όπου  $I_b=1-(2 \times |0,5-p|)$  και  $p$  είναι το ποσοστό των γονότυπων που έχουν τη ζώνη I.

Η γενετική ομοιότητα υπολογίστηκε με βάση τον συντελεστή του Jaccard (Sneath and Sokal, 1973) και προέκυψε μια τριγωνική μήτρα με τους συντελεστές γενετικής ομοιότητας των γονότυπων ανά ζεύγη. Με τη χρήση του αλγορίθμου ομαδοποίησης UPGMA (Sneath and Sokal, 1973) κατασκευάστηκε ένα δενδρόγραμμα για τους 56 γονότυπους. Για να εκτιμηθεί η καλή προσαρμογή (goodness of fit) της ανάλυσης UPGMA υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης (cophenetic correlation coefficient), μεταξύ του δενδρογράμματος και της τριγωνικής μήτρας των συντελεστών γενετικής ομοιότητας, εφαρμόζοντας την ανάλυση MxComp στο λογισμικό NTSYS-pc (Rohlf, 1998). Τα όρια εμπιστοσύνης των βραχιόνων του δενδρογράμματος υπολογίστηκαν με την ανάλυση bootstrap με 1000 μεταθέσεις με τη χρήση

του προγράμματος Winboot (Yap and Nelson, 1996). Με βάση το συντελεστή απόστασης του Manhattan, από τα δεδομένα των μορφολογικών χαρακτηριστικών, κατασκευάστηκε μια μήτρα ομοιότητας η οποία συγκρίθηκε με τη μήτρα που προέκυψε από τα δεδομένα ISSR, εφαρμόζοντας το κριτήριο του Mantel (Sneath and Sokal, 1973). Για όλες τις αναλύσεις, εκτός από όπου αναφέρεται, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό NTSYS-pc (Rohlf, 1998).

Για να εκτιμηθεί η παραλλακτικότητα των ελληνικών επιλογών, εντός της περιοχής συλλογής τους και μεταξύ των περιοχών, εφαρμόστηκε η ανάλυση της μοριακής διασποράς (AMOVA). Η συνολική παραλλακτικότητα κατανεμήθηκε σε δύο ιεραρχικά επίπεδα: ένα επίπεδο μεταξύ των γονότυπων από την ίδια περιοχή συλλογής και ένα δεύτερο επίπεδο μεταξύ των γονότυπων από διαφορετικές περιοχές συλλογής. Επίσης εκτιμήθηκε η γενετική απόσταση, ανά ζεύγη, μεταξύ των ομάδων γονότυπων από τις διάφορες περιοχές συλλογής, υπολογίζοντας τις τιμές PhiPT. Οι τιμές αυτές αντιστοιχούν στο ποσοστό, ανά ζεύγη, της παραλλακτικότητας των πληθυσμών σε σχέση με τη συνολική παραλλακτικότητα. Η AMOVA πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό GenAlex-v.6 (Peakall and Smouse, 2006) χρησιμοποιώντας 999 μεταθέσεις.

### 1.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 1.3.1. Μοριακοί δείκτες ISSR στην ανάλυση του γενετικού υλικού της καρδιάς

Συνολικά ενισχύθηκαν 93 προϊόντα DNA (ζώνες) με μοριακά βάρη από 200 έως 1480 bp με τη χρήση επτά εκκινητών ISSR με δι-νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (17-18 mers, Πίνακας 1.3).

Δύο χαρακτηριστικές εικόνες, με τη χρήση του εκκινητή 818 όπου ενίσχυσε μικρού μοριακού βάρους ζώνες (200-700 bp) και με τη χρήση του 859 που έδωσε ενισχυμένα προϊόντα μεγάλου μοριακού βάρους (700-1480 bp) παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.2. Ο αριθμός των ενισχυμένων ζωνών ανά εκκινητή κυμάνθηκε από 7 έως 20 με μέσο όρο 13,3, ενώ οι πολυμορφικές ζώνες κυμάνθηκαν από 3 έως 20 με μέσο αριθμό 11 ανά εκκινητή. Το ποσοστό πολυμορφικών ζωνών ανά εκκινητή κυμάνθηκε από 42,9% με τον 830 έως 100% με τους 814 και 818, με μέσο συνολικό πολυμορφισμό 82,5% (Πίνακας 1.3).

**Πίνακας 1. 3.** Η νουκλεοτιδική αλληλουχία και τα χαρακτηριστικά της διακριτικής ικανότητας των ISSR μοριακών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν για το μοριακό χαρακτηρισμό των γονοτύπων καρδιάς.

Κωδικός δείκτη	Αλληλουχία 5' προς 3' <sup>†</sup>	Αριθμός ζωνών		ΠΠ <sup>††</sup> (%)	PIC <sup>††, †††</sup>	MI <sup>††</sup>	Rp <sup>††</sup>	ΓΔ <sup>††</sup>
		Σ <sup>††</sup>	Π <sup>††</sup>					
814	(CT) <sub>8</sub> A	20	20	100,0	0,295 (0,069-0,494)	5,89	8,18	43
817	(CA) <sub>8</sub> A	9	7	77,7	0,209 (0,035-0,490)	1,46	2,11	3
818	(CA) <sub>8</sub> G	15	15	100,0	0,301 (0,069-0,494)	4,51	6,39	41
827	(AC) <sub>8</sub> G	12	9	75,0	0,350 (0,035-0,499)	3,15	4,75	27
828	(TG) <sub>8</sub> A	14	10	71,4	0,304 (0,069-0,490)	3,04	4,29	24
830	(TG) <sub>8</sub> G	7	3	42,9	0,229 (0,035-0,337)	0,69	0,86	1
859	(TG) <sub>8</sub> RC	16	13	81,3	0,276 (0,069-0,497)	3,58	5,04	35
Σύνολο		93	77	-	-	-	-	-
M.O.		13.3	11	82,9	0,280	3,19	4,52	24,86

<sup>†</sup> A: αδενίνη, T: θυμίνη, G: γουανίνη, C: κυτοσίνη, R = (A, G).

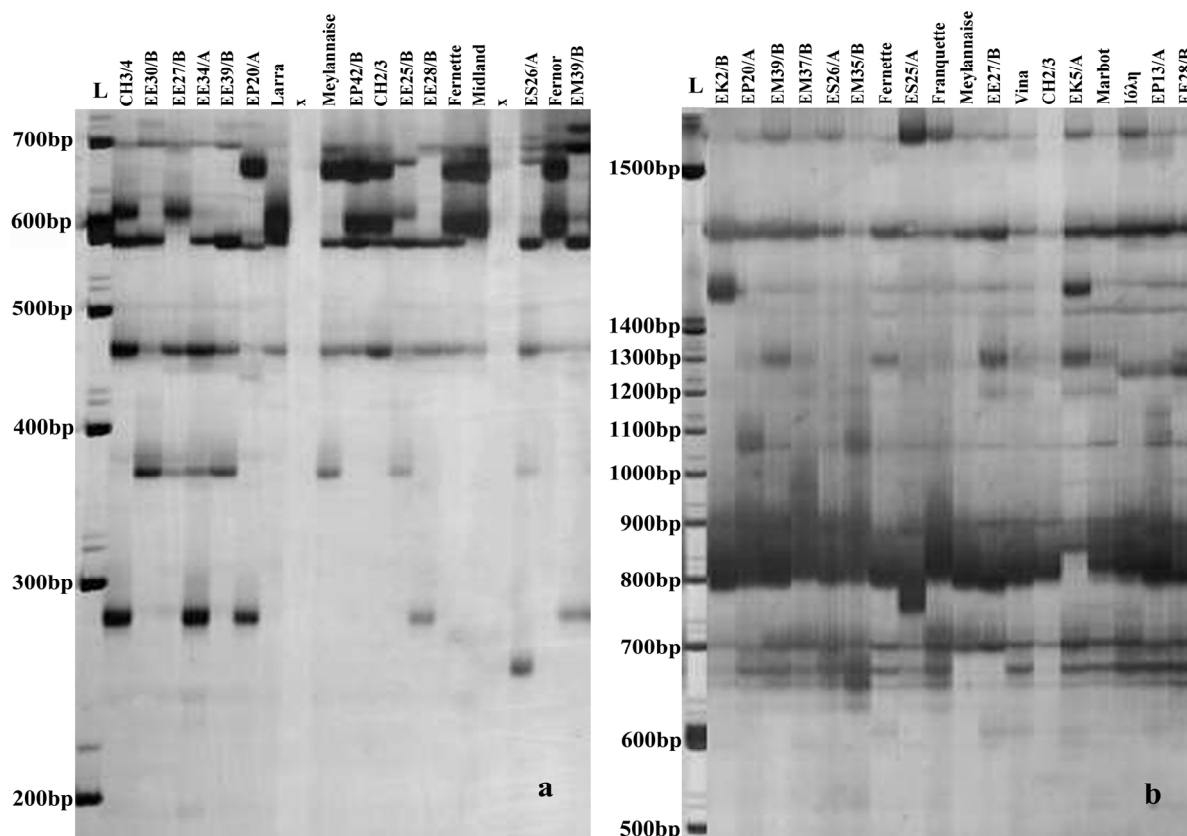
<sup>††</sup> Σ: Συνολικές, Π: Πολυμορφικές, ΠΠ: Ποσοστό Πολυμορφισμού, PIC: Polymorphic Information Content, MI: Marker Index, Rp: Resolving power, ΓΔ: Γονότυποι που διαχωρίζονται.

<sup>†††</sup> Το PIC, για κάθε δείκτη εκφράζεται ως το μέσο PIC των τόπων που επισημάνθηκαν. Εντός παρενθέσεως δίνεται το εύρος του PIC μεταξύ των τόπων του κάθε δείκτη.

Οι έξι από τους επτά εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν εμφάνισαν πάνω από 71,4% πολυμορφισμό και μόνο ο εκκινητής 830 έδωσε λιγότερο από 50% πολυμορφισμό. Ανά τόπο που επισημάνθηκε το PIC κυμάνθηκε από 0,035 έως 0,499 και το μέσο PIC ανά εκκινητή ήταν από 0,209 για τον 817 έως 0,350 για τον 827. Αντίστοιχα το MI κυμάνθηκε από 0,69 για τον εκκινητή 830 έως 5,89 για τον 814, ενώ το Rp ήταν μεταξύ 0,86 και 8,18 για τους



εκκινητές 830 και 814, αντίστοιχα. Ο αριθμός των γονότυπων ανά εκκινητή που διαχωρίστηκαν ήταν από 1 έως 43 για τους εκκινητές 830 και 814, αντίστοιχα, ωστόσο ο εκκινητής 830 έδωσε μοναδικό ίχνος ζωνών για την ελληνική ποικιλία Ηλιάνα. Οι 54 από τους 56 γονότυπους μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν με τη χρήση ενός εκκινητή, ενώ οι ποικιλίες Fernette και Pedro χρειάστηκαν περισσότερους από έναν εκκινητές (Πίνακας 1.4).



**Εικόνα 1. 2.** Ενισχυμένα προϊόντα γονότυπων καρδιάς με μοριακούς δείκτες ISSR. a) εκκινητής UBC-818, b) εκκινητής UBC-859. L: κλίμακα μοριακών βαρών, X: κενό κελί.

**Πίνακας 1. 4.** Τα μοναδικά ίχνη ενισχυμένων προϊόντων των 56 γονότυπων καρδιάς, για τον κάθε εκκινητή και οι εκκινητές που απαιτούνται για την ταυτοποίηση του κάθε γονότυπου.

Όνομα γονότυπου	814	817	818	827	828	830	859	Εκκινητές για ταυτοποίηση <sup>†</sup>	
								Αρ. <sup>††</sup>	Εκκινητής
EE25/B	+ <sup>††</sup>	-	+	+	+	-	-	1	814
EE27/B	+	-	+	+	+	-	-	1	814
EE28/B	- <sup>††</sup>	-	+	-	-	-	-	1	818
EE30/B	-	+	+	+	-	-	-	1	818
EE34/A	+	-	+	+	+	-	+	1	814
EE39/B	-	+	+	+	-	-	-	1	818
EK1/A	+	-	-	+	+	-	+	1	814
EK2/A	+	-	+	-	-	-	+	1	814
EK2/B	-	-	+	-	-	-	-	1	818
EK3/B	+	-	+	-	-	-	+	1	814

**Πίνακας 1. 4.** Τα μοναδικά ίχνη ενισχυμένων προϊόντων των 56 γονότυπων καρδιάς, για τον κάθε εκκινητή και οι εκκινητές που απαιτούνται για την ταυτοποίηση του κάθε γονότυπου.

Όνομα γονότυπου	814	817	818	827	828	830	859	Εκκινητές για ταυτοποίηση <sup>†</sup>	
								Αρ. <sup>††</sup>	Εκκινητής
EK4/A	+	-	+	-	-	-	+	1	814
EK5/A	+	-	-	-	-	-	-	1	814
EM34/B	+	-	-	-	-	-	+	1	814
EM35/B	+	-	+	+	+	-	+	1	814
EM36/B	-	-	+	+	-	-	+	1	818
EM37/B	+	-	+	+	-	-	+	1	814
EM39/B	+	-	+	-	+	-	+	1	814
EP6/A	+	-	+	-	+	-	-	1	814
EP13/A	+	-	+	-	-	-	+	1	814
EP20/A	+	-	+	+	-	-	+	1	814
EP42/B	+	-	+	-	-	-	+	1	814
ES22/A	+	-	+	-	-	-	+	1	814
ES25/A	+	-	+	-	+	-	+	1	814
ES26/A	+	-	+	+	+	-	+	1	814
ES28/A	+	+	+	+	+	-	+	1	814
FM3	+	-	+	+	-	-	+	1	814
FM6	-	-	+	-	-	-	+	1	818
‘Amigo’	+	-	-	-	-	-	+	1	814
‘Ashley’	+	-	+	-	-	-	+	1	814
‘Chandler’	+	-	+	-	+	-	-	1	814
‘Gustine’	+	-	+	-	+	-	+	1	814
‘Hartley’	+	-	+	-	-	-	-	1	814
‘Midland’	+	-	-	-	-	-	-	1	814
‘Pedro’	-	-	-	-	-	-	-	2	814, 818
‘Serr’	+	-	+	+	-	-	+	1	814
‘Spurgeon’	+	-	+	-	+	-	-	1	814
‘Vina’	+	-	+	-	-	-	+	1	814
‘Franquette’	+	-	+	+	-	-	-	1	814
‘Fernette’	-	-	-	-	-	-	-	2	814, 818
‘Fernor’	-	-	+	-	+	-	-	1	818
‘Grand jean’	+	-	+	+	+	-	+	1	814
‘Grosvert’	-	-	-	+	-	-	+	1	859
‘Lara’	+	-	+	+	+	-	-	1	814
‘Marbot’	-	-	+	-	-	-	-	1	818
‘Meylannaise’	+	+	+	+	-	-	-	1	814
‘Parisienne’	-	-	+	+	-	-	-	1	818
‘R du Mont.’	-	-	+	-	+	-	-	1	818
‘Sibisel 39’	+	-	+	-	+	-	-	1	814
‘Bigtop’	+	-	+	-	+	-	-	1	814
CH 2/3	+	-	-	-	-	-	+	1	814

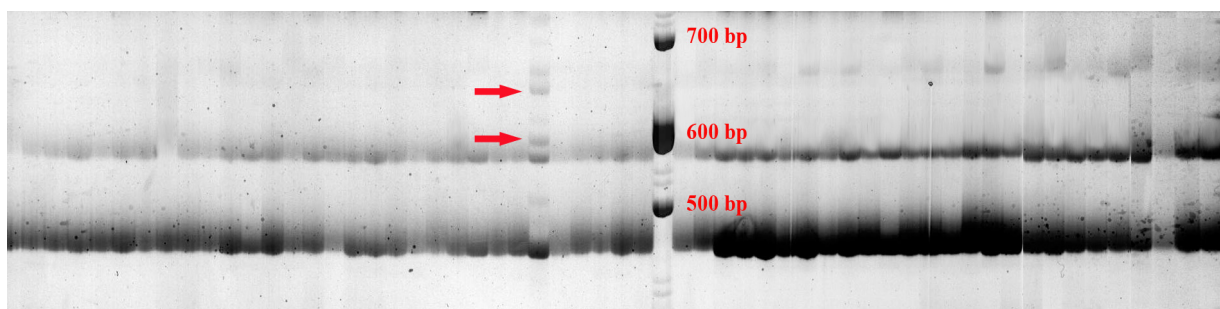
**Πίνακας 1. 4.** Τα μοναδικά ίχνη ενισχυμένων προϊόντων των 56 γονότυπων καρυδιάς, για τον κάθε εκκινητή και οι εκκινητές που απαιτούνται για την ταυτοποίηση του κάθε γονότυπου.

Όνομα γονότυπου	814	817	818	827	828	830	859	Εκκινητές για ταυτοποίηση <sup>†</sup>	
								Αρ. <sup>††</sup>	Εκκινητής
CH 3/4	+	-	-	+	+	-	+	1	814
EAA26/A	+	-	+	-	+	-	+	1	814
‘Ηλιάννα’	+	-	-	-	-	+	+	1	814
‘Ιόλη’	+	-	+	+	+	-	+	1	814
‘Π. Hartley’	+	-	-	-	+	-	+	1	814
‘Λητώ’	+	-	+	-	-	-	+	1	814

<sup>†</sup>Αριθμός και εκκινητής που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ταυτοποιηθεί ο γονότυπος.

<sup>††</sup> + : μοναδικό ίχνος, - : μη μοναδικό ίχνος, Αρ.: αριθμός.

Ο αριθμός των ζωνών ανά γονότυπο καρυδιάς που μελετήθηκε κυμάνθηκε από 17 στην επιλογή ES22/A, έως 41 στις ποικιλίες Serr και Gustine, με 30,9 μέσο αριθμό ζωνών ανά γονότυπο. Η ποικιλία Sibisel 39 εμφάνισε δύο μοναδικές ζώνες στα 590 και 650 bp με τη χρήση του εκκινητή 817 (Εικόνα 1.3). Η ‘Λητώ’ και η ‘Πλαγιόκαρπη Hartley’ εμφάνισαν από μια μη γονική ζώνη στα 571 και 428 bp, αντίστοιχα, με τον εκκινητή 814 και το ποσοστό των μη γονικών ζωνών ήταν 0,1% επί του συνολικού αριθμού πολυμορφικών ζωνών.



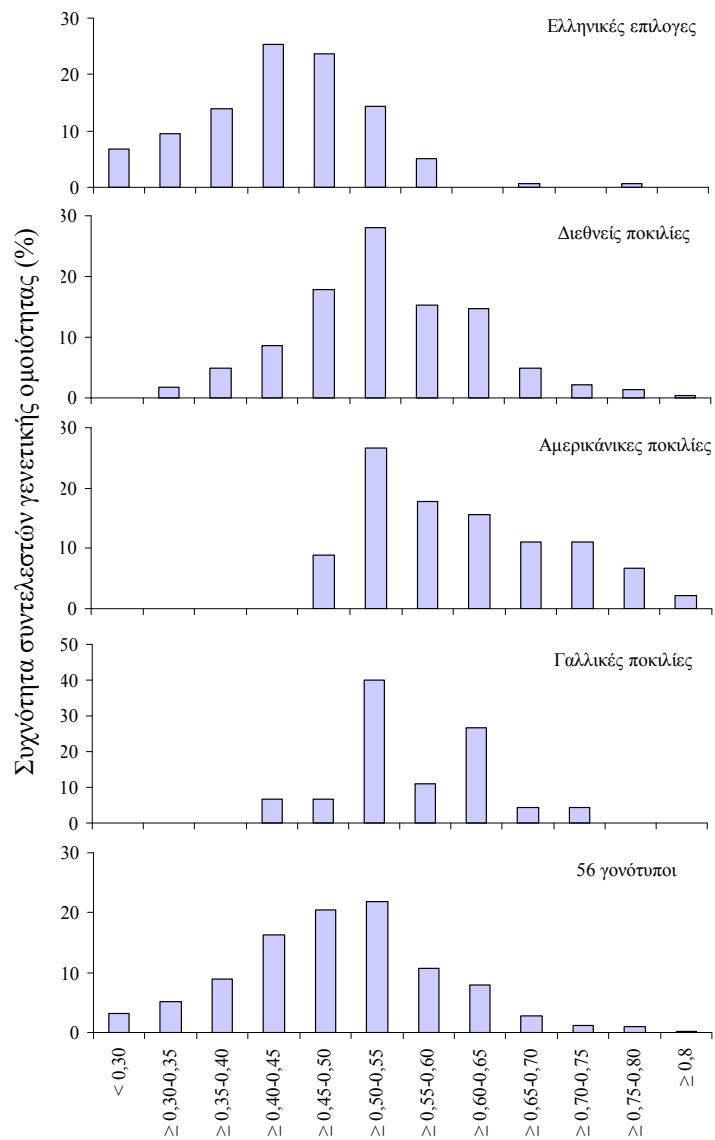
**Εικόνα 1. 3.** Οι δύο μοναδικές ζώνες που εμφάνισε ο γονότυπος Sibisel 39, στα 590 και 650 bp με τη χρήση του εκκινητή 817.

### 1.3.2. Γενετικές ομοιότητες και ομαδοποίηση γονότυπων καρυδιάς

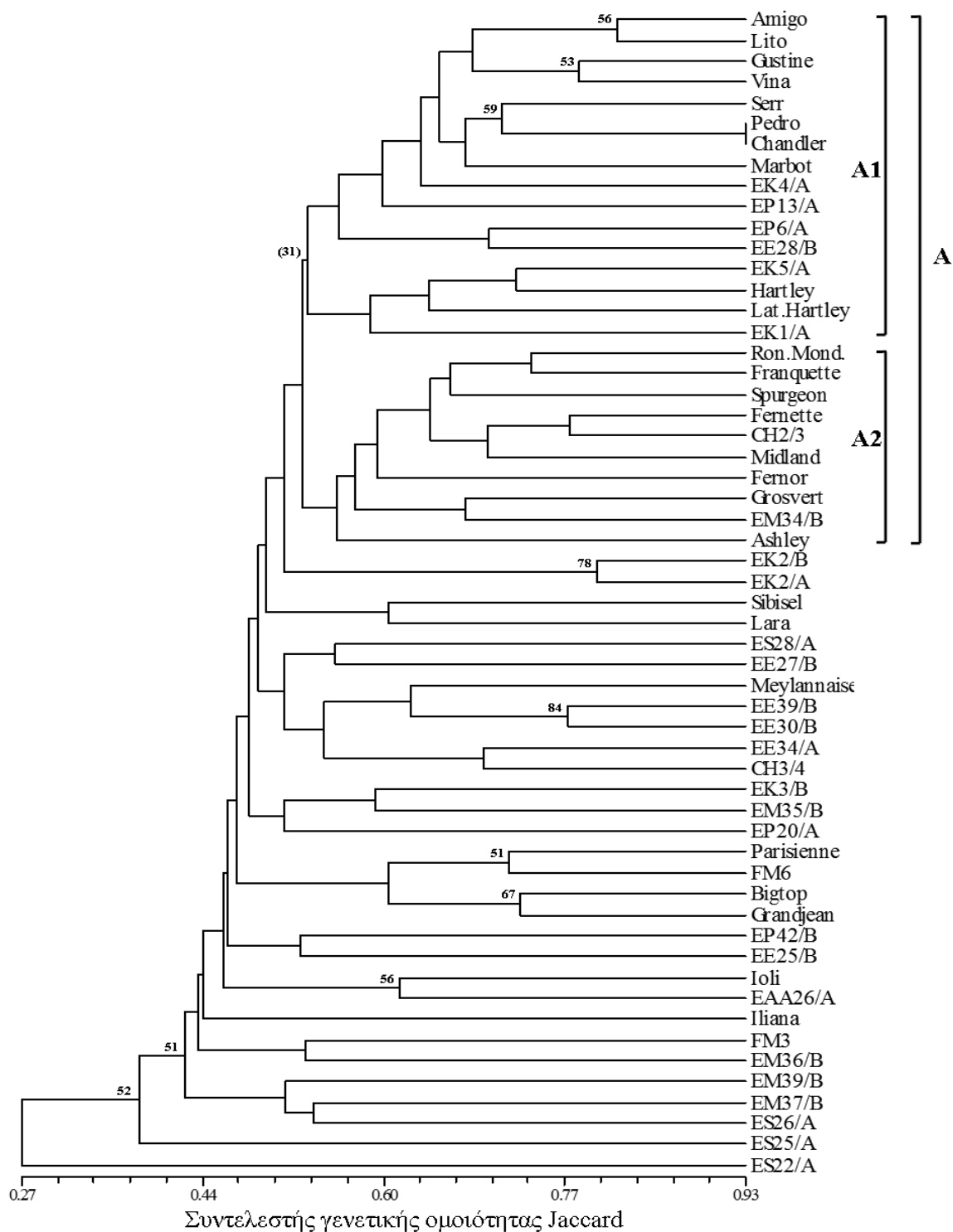
Για την εκτίμηση της γενετικής ομοιότητας μεταξύ των γονότυπων καρυδιάς ανά ζεύγη χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής του Jaccard και οι συντελεστές ομοιότητας των 56 γονότυπων κυμάνθηκαν από 0,13 μεταξύ ES22/A και EK3/B, έως 0,93 μεταξύ ‘Pedro’ και ‘Chandler’. Ο πλήρης πίνακας των συντελεστών ομοιότητας ανά ζεύγη παρατίθεται στο Παράρτημα Ι. Εξετάζοντας όλους τους γονότυπους ο μέσος συντελεστής ομοιότητας ήταν 0,48 και η πλειονότητα των συντελεστών κυμάνθηκε μεταξύ 0,40 και 0,55, ενώ εξετάζοντας τους γονότυπους σε ομάδες ανάλογα με τον τόπο καταγωγής τους παρατηρήθηκαν διαφορές στις τιμές των συντελεστών (Γράφημα 1.1). Συγκεκριμένα μεταξύ των διεθνών ποικιλιών βρέθηκαν υψηλότεροι συντελεστές ομοιότητας που η μεγαλύτερη συχνότητά τους ήταν πάνω

από 0,45 με μέσο συντελεστή 0,56, ενώ μεταξύ των ελληνικών τοπικών επιλογών η πλειονότητα των συντελεστών κυμάνθηκε κάτω από 0,55 με μέσο συντελεστή 0,44. Ακόμα υψηλότεροι συντελεστές ομοιότητας βρέθηκαν εξετάζοντας τις ποικιλίες που προέρχονται από τις ΗΠΑ για τις οποίες η πλειονότητα των συντελεστών τους ήταν πάνω από 0,50 με μέσο συντελεστή 0,61.

Στο δένδρογραμμα που προέκυψε, με τη χρήση του αλγόριθμου UPGMA, διακρίθηκε μια κύρια ομάδα γονοτύπων (A) η οποία περιελάμβανε κυρίως τις περισσότερες διεθνείς ποικιλίες και ορισμένες ελληνικές επιλογές (Εικόνα 1.4). Η δοκιμασία του Mantel (Sneath and Sokal, 1973) έδειξε καλή προσαρμογή (good fit) της ομαδοποίησης των γονοτύπων καθώς ο συντελεστής συσχέτισης μεταξύ του πρότυπου πίνακα συντελεστών γενετικής ομοιότητας και του δένδρογραμματος ήταν πολύ υψηλός ( $r > 0,99$ ;  $t = 9,843$ ;  $P < 0,0001$ ). Η δοκιμασία bootstrap αποκάλυψε την ύπαρξη χαμηλής τιμής bootstrap (31,3%) για την ομάδα A, η οποία όμως ήταν από τις υψηλότερες μεταξύ των τιμών των υπολοίπων ομάδων που θα μπορούσαν να διαχωριστούν μεταξύ των 56 γονοτύπων του πειράματος. Εντός της ομάδας A δύο υποομάδες A1 και A2 διακρίθηκαν λαμβάνοντας υπόψη τη γενεαλογία των γονοτύπων και τους συντελεστές συσχέτισής τους.



**Γράφημα 1. 1.** Κατανομή των συντελεστών ομοιότητας (Jaccard) μεταξύ των 56 γονοτύπων καρδιάς και των ομάδων τους με βάση τον τύπο καταγωγής τους, που προέκυψαν κατά τη μελέτη τους με επτά ISSR εκκινητές.



**Εικόνα 1. 4.** Δενδρόγραμμα με βάση την ανάλυση UPGMA των συντελεστών ομοιότητας του Jaccard που προέκυψαν από την μελέτη 56 γονότυπων καρυδιάς με επτά ISSR εκκινητές. Τα νούμερα στους βραχίονες αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap και επισημαίνονται μόνο τιμές πάνω του 50%.

Με ορισμένες εξαιρέσεις η ομάδα A1 περιλαμβάνει τις περισσότερες ποικιλίες που προέρχονται από τις ΗΠΑ και έχουν γνωστή γενεαλογία όπως οι ‘Amigo’, ‘Chandler’, ‘Hartley’, ‘Gustine’, ‘Pedro’, ‘Serr’ και ‘Vina’, καθώς επίσης και τους γονότυπους ‘Πλαγιόκαρπη Hartley’ και ‘Λητώ’ που δημιουργήθηκαν στο ΕΘΙΑΓΕ Βαρδάτων και έχουν ως γονείς ποικιλίες από την Καλιφόρνια. Επίσης στην ομάδα αυτή υπάρχουν η γαλλικής

προέλευσης ποικιλία Marbot καθώς και πέντε ελληνικές επιλογές προερχόμενες από τέσσερις διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας.

Στην ομάδα A2 συμπεριλήφθηκαν πέντε γονότυποι με προέλευση από τη Γαλλία ('Ronde du Montignac', 'Franquette', 'Fernette', 'Fernor' και 'Grossvert'), τρεις από τις ΗΠΑ ('Spurgeon', 'Midland' και 'Ashley') και δύο από την Ελλάδα (CH2/3 και EM34/B). Ο μικρότερος συντελεστής γενετικής ομοιότητας μεταξύ των παραπάνω γονοτύπων ήταν 0,45 μεταξύ 'Ronde du Montignac' και EM34/B, ενώ όλα τα υπόλοιπα ζεύγη είχαν μεγαλύτερο συντελεστή ομοιότητας.

Οι γονότυποι που δεν συμπεριλαμβάνονται στην ομάδα A είχαν σχετικά χαμηλούς συντελεστές ομοιότητας μεταξύ τους και δεν μπορούν να θεωρηθούν σαν μια αυτοτελής ομάδα, καθώς επίσης και οι περισσότεροι βραχίονες αυτού του τμήματος του δενδρογράμματος είχαν τιμές bootstrap μικρότερες του 50%. Στο τμήμα αυτό του δενδρογράμματος βρίσκονται 25 ελληνικές επιλογές, τέσσερις γονότυποι με προέλευση από τη Γαλλία και ο μόνος γονότυπος με προέλευση από τη Ρουμανία μεταξύ των 56 που εξετάστηκαν. Ωστόσο μεταξύ των γονοτύπων αυτών ορισμένα ζεύγη παρουσίασαν υψηλή γενετική ομοιότητα, όπως οι EK2/A και EK2/B με συντελεστή 0,79 (bootstrap 78%), καθώς και η επιλογή EE30/B με την επιλογή EE39/B με συντελεστή 0,77 (bootstrap 84%).

### 1.3.3. Ανάλυση της μοριακής διασποράς για τις ελληνικές επιλογές καρυδιάς

Η ανάλυση της μοριακής διασποράς (AMOVA) των ελληνικών επιλογών από τις πέντε γεωγραφικές περιοχές αποκάλυψε ότι σημαντική παραλλακτικότητα υπάρχει τόσο εντός όσο και μεταξύ των περιοχών (Πίνακας 1.5). Ωστόσο το 89% και το 11%, της συνολικής γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ των γονοτύπων αυτών, κατανέμεται εντός και μεταξύ των περιοχών συλλογής, αντίστοιχα.

**Πίνακας 1. 5.** Ανάλυση της μοριακής διασποράς (AMOVA) των ελληνικών επιλογών καρυδιάς από τις πέντε περιοχές συλλογής.

Πηγή παραλλακτικότητας	BE <sup>†</sup>	AT <sup>†</sup>	MT <sup>†</sup>	Συστατικά διασποράς	Ολική διασπορά (%)	P <sup>†</sup>
Μεταξύ των περιοχών	4	73,802	28,451	1,331	11	0,001
Εντός των περιοχών	23	254,340	11,058	11,058	89	0,001
Σύνολο	27	328,143	29,509	12,389	-	-

<sup>†</sup> BE: Βαθμοί Ελευθερίας, AT: Αθροισμα Τετραγώνου, MT: Μέσο Τετράγωνο, P: Πιθανότητα.

Εξετάζοντας τις πιθανότητες ύπαρξης παραλλακτικότητας, μεταξύ των περιοχών συλλογής ανά ζεύγη, παρατηρήθηκε ότι κάθε περιοχή παραλλάσει σημαντικά με τις υπόλοιπες, πλην της Πελοποννήσου όπου φάνηκε να παραλλάσει γενετικά μόνο με τη

Μακεδονία (Πίνακας 1.6). Οι τιμές PhiPT των ζευγών των περιοχών κυμάνθηκαν από 0,014 μεταξύ Πελοποννήσου και Ηπείρου έως 0,153 μεταξύ Κρήτης και Ηπείρου. Οι τιμές PhiPT αντιστοιχούν στο ποσοστό της παραλλακτικότητας των πληθυσμών ανά ζεύγη σε σχέση με τη συνολική παραλλακτικότητα.

**Πίνακας 1. 6.** Τιμές PhiPT και πιθανότητες μεταξύ των πέντε ελληνικών περιοχών συλλογής γονοτύπων καρδιάς.

Περιοχή συλλογής	Στερεά	Πελοπόννησος	Κρήτη	Ήπειρος	Μακεδονία
Στερεά	-	0,123 <sup>††</sup>	0,001	0,011	0,009
Πελοπόννησος	0,050 <sup>†</sup>	-	0,144	0,347	0,029
Κρήτη	0,126	0,074	-	0,005	0,026
Ήπειρος	0,122	0,014	0,153	-	0,035
Μακεδονία	0,140	0,119	0,124	0,086	-

<sup>†</sup> Τιμές PhiPT και οι πιθανότητες παρουσιάζονται κάτω και πάνω από τη διαγώνιο.

<sup>††</sup> Πιθανότητες με βάση 999 αντιμεταθέσεις.

#### **1.3.4. Συσχέτιση μεταξύ μοριακών και μορφολογικών δεδομένων του γενετικού υλικού της καρδιάς**

Για τους 56 γονότυπους που εξετάστηκαν δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των μοριακών και των μορφολογικών δεδομένων. Με τη δοκιμή Mantel, μεταξύ του πίνακα γενετικής ομοιότητας με βάση τον συντελεστή Jaccard από τα μοριακά δεδομένα και του πίνακα γενετικής απόστασης με βάση το συντελεστή Manhattan από τα μορφολογικά δεδομένα, δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δύο πινάκων ( $r < -0,043$ ,  $t = -0,715$ ,  $P = 0,237$ ).



## 1.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

### 1.4.1. Μοριακοί δείκτες ISSR στην ανάλυση του γενετικού υλικού της καρδιάς

Οι μοριακοί δείκτες ISSR θεωρούνται χρήσιμοι σε μελέτες που αφορούν τη γενετική παραλλακτικότητα, τη φυλογένεση, τη χαρτογράφηση γονιδίων και την εξελικτική βιολογία (Reddy et al., 2002). Έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην καρδιά (Potter et al., 2002; Pollegioni et al., 2003), καθώς και σε άλλα δενδρώδη είδη όπως την ελιά (Terzopoulos et al., 2005), τη συκιά (Amel et al., 2005), τη μουριά (Vijayan et al., 2006) και τη δαμασκηλιά (Liu et al., 2007). Το ποσοστό του πολυμορφισμού που αποκαλύπτεται με τη χρήση των ISSR ποικίλει ανάλογα με το γενετικό υλικό που εξετάζεται, τους συγκεκριμένους εκκινητές ISSR που χρησιμοποιούνται και τη μέθοδο διαχωρισμού των ενισχυμένων προϊόντων που χρησιμοποιείται. Στους παραπάνω λόγους μπορεί να αποδοθεί το γεγονός ότι το ποσοστό πολυμορφισμού, καθώς επίσης και ο μέσος αριθμός πολυμορφικών ζωνών που ανακτήθηκαν ανά εκκινητή στην παρούσα εργασία διαφέρουν από αυτά που βρέθηκαν σε άλλες μελέτες με μοριακούς δείκτες στην καρδιά. Συγκεκριμένα οι (Nicese et al., 1998) αναφέρουν 25% πολυμορφισμό και δύο πολυμορφικές ζώνες ανά RAPD εκκινητή, οι (Kafkas et al., 2005) βρήκαν 50,7% πολυμορφισμό και 14,8 πολυμορφικές ζώνες ανά εκκινητή, ενώ στην πρώτη μελέτη γενετικού υλικού καρδιάς που έγινε με τη χρήση ISSR αναφέρεται 57% πολυμορφισμός και 3,9 πολυμορφικές ζώνες ανά εκκινητή (Potter et al., 2002). Τα αυξημένα ποσοστά πολυμορφισμού και αριθμού πολυμορφικών ζωνών ανά εκκινητή στην παρούσα μελέτη σε σχέση με αυτή των Potter et al. (2002), πέρα από το διαφορετικό γενετικό υλικό που εξετάστηκε και τους διαφορετικούς εκκινητές ISSR που χρησιμοποιήθηκαν, μπορεί να αποδοθεί στον ευκρινέστερο διαχωρισμό των ενισχυμένων προϊόντων στην πηκτή πολυακρυλαμίδης σε σχέση με την πηκτή αγαρόζης (Reddy et al., 2002).

Το υψηλότερο ποσοστό πολυμορφισμού (100%) έδωσαν οι εκκινητές 814 και 818 γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στο είδος των δι-νουκλεοτιδικών τους αλληλουχιών, καθώς είχαν (CT) και (CA) αλληλουχίες, αντίστοιχα. Εκκινητές με (AG), (GA), (CT), (TC), (CA) και (AC) αλληλουχίες ανιχνεύουν γενικότερα υψηλότερα επίπεδα πολυμορφισμού σε σχέση με εκκινητές με άλλες δι-, τρι- ή τέτρα-νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (Reddy et al., 2002).

Μεταξύ των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ο πολυμορφισμός, ο αριθμός ζωνών, καθώς επίσης και οι τιμές MI και Rp, ήταν οι υψηλότερες για τον 814 και οι χαμηλότερες για τον 830, έτσι ο 814 θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ο πιο κατάλληλος για τη μελέτη γονότυπων της καρδιάς, ενώ ο 830 ως ο λιγότερο κατάλληλος. Ωστόσο οι 814 και 830 δεν είχαν αντίστοιχα την υψηλότερη και χαμηλότερη τιμή PIC, καθώς στον υπολογισμό του δείκτη αυτού, δεν λαμβάνεται υπόψη ο συνολικός αριθμός των ζωνών που ενισχύονται με τη χρήση ενός συγκεκριμένου εκκινητή, αλλά εκτιμάται η μέση διακριτική ικανότητα των τύπων

που ενισχύει. Οι υπόλοιποι πέντε εκκινητές δεν μπορούν να καταταχθούν σε μια σειρά για την καταλληλότητα τους στην μελέτη της καρυδιάς, καθώς η σειρά τους διαφέρει ανάλογα με την παράμετρο που εξετάζεται (ποσοστό πολυμορφισμού, αριθμός ζωνών, PIC, MI, Rp). Οι Prevost and Wilkinson (1999) αναφέρουν υψηλή γραμμική σχέση μεταξύ της ικανότητας ενός εκκινητή να διαχωρίσει γονότυπους και του Rp αντί του MI, παρόλα αυτά αναφέρουν ότι σε ορισμένες περιπτώσεις το Rp δεν είναι το μόνο προαπαιτούμενο χαρακτηριστικό ενός εκκινητή ώστε να είναι ικανός να διαχωρίσει γονότυπους. Εφόσον οι παράμετροι PIC, MI και Rp δεν μπορούν πάντα να αξιολογήσουν την καταλληλότητα ενός εκκινητή, είναι προτιμότερο να καταγράφεται πόσους γονότυπους είναι ικανός ένας εκκινητής να διαχωρίσει (Laurentin and Karlovsky, 2007). Έτσι, στην παρούσα μελέτη οι επτά εκκινητές, με βάση τον αριθμό των γονότυπων που μπορεί ο κάθε ένας να διαχωρίσει, κατατάσσονται  $814 > 818 > 859 > 827 > 828 > 817 > 839$ .

Οι δύο μοναδικές ζώνες που ενισχύθηκαν με τον εκκινητή 817 στη 'Sibisel 39', το μόνο γονότυπο μεταξύ των 56 που εξετάστηκαν με προέλευση από τη Ρουμανία, πιθανόν να υποδεικνύουν ένα χαρακτηριστικό μοναδικό τόπο για το Ρουμάνικο γενετικό υλικό, ωστόσο αυτή είναι μια ένδειξη μόνο, καθώς απαιτείται η μελέτη περισσότερων γονότυπων από τη Ρουμανία. Στην παρούσα μελέτη το ποσοστό των μη-γονικών ζωνών ήταν χαμηλότερο από αυτό που επισημάνθηκε (0,27%) στην πρώτη μελέτη γονότυπων καρυδιάς με ISSR δείκτες (Potter et al., 2002). Η επισήμανση μη-γονικών ζωνών έχει παρατηρηθεί σε αρκετές μελέτες με διάφορους μοριακούς δείκτες, θεωρείται μειονέκτημα των μοριακών αναλύσεων και έχει αποδοθεί σε γεγονότα μετάλλαξης εντός των μερών σύνδεσης του εκκινητή, ποικίλους ανασυνδυασμούς εντός των ενισχυμένων προϊόντων και σωματικές ανακατατάξεις στα γονικά φυτά (Goulao et al., 2001; Halldén et al., 1996; Nicese et al., 1998; Potter et al., 2002). Οι μη-γονικές ζώνες θεωρούνται μειονέκτημα των μοριακών δεικτών, το οποίο μπορεί να ξεπεραστεί με τη χρήση μεγάλου αριθμού εκκινητών (Potter et al., 2002).

#### ***1.4.2. Γενετικές ομοιότητες και ομαδοποίηση γονότυπων καρυδιάς***

Οι σχετικά υψηλότεροι συντελεστές γενετικής ομοιότητας που βρέθηκαν μεταξύ των διεθνών ποικιλιών σε σχέση με τις ελληνικές επιλογές ενισχύει την άποψη της ύπαρξης υψηλής γενετικής παραλλακτικότητας στους ελληνικούς πληθυσμούς καρυδιάς. Στο δενδρόγραμμα οι περισσότερες διεθνείς ποικιλίες (16 από τις 21) τοποθετήθηκαν στην ομάδα A, ενώ στην υποομάδα A1 όλες οι ποικιλίες που περιλαμβάνονται έχουν ως πρόγονο την 'Payne', εκτός από την 'Marbot' και την 'Hartley'. Στην υποομάδα A2 περιλαμβάνονται ποικιλίες που είτε έχουν πρόγονο την γαλλική ποικιλία Franquette, είτε είναι γαλλικές επιλογές. Ποικιλίες που έχουν προέλθει από διασταυρώσεις μεταξύ 'Payne' και 'Franquette' περιλαμβάνονται είτε στην υποομάδα A1 είτε στην A2, όπως η 'Vina' που ομαδοποιείται με

τους απόγονους της ‘Payne’, και η ‘Midland’ που ομαδοποιείται με τους απόγονους της ‘Franquette’. Ωστόσο οι τιμές bootstrap των διαφόρων κλάδων στου δενδρογράμματος ήταν χαμηλές (< 50%) γεγονός που σημαίνει ότι πολλές από τις σχέσεις που απεικονίζονται στο δενδρογράμμα δεν υποστηρίζονται ισχυρά από τα δεδομένα. Το γεγονός αυτό έχει παρατηρηθεί κατά τη μελέτη του γονοτυπικού υλικού της καρυδιάς με διάφορους μοριακούς δείκτες όπως RAPD (Nicese et al., 1998), RFLP (Fjellstrom et al., 1994), ISSR (Potter et al., 2002) και AFLP-SAMPL (Kafkas et al., 2005).

Επίσης στην παρούσα όπως και σε άλλες μελέτες γονότυπων καρυδιάς με μοριακούς δείκτες (Dangl et al., 2005; Ebrahimi et al., 2011; Erturk et al., 2011; Fjellstrom et al., 1994; Ma et al., 2011; Nicese et al., 1998; Potter et al., 2002), η ομαδοποίηση των γονότυπων δεν ακολουθεί πλήρως τη γενεαλογία, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε πολλούς λόγους. Οι διαθέσιμες γενεαλογίες που υπάρχουν για τις διεθνείς ποικιλίες καρυδιάς περιλαμβάνουν μέχρι δύο γενιές γεγονός που καθιστά δύσκολη την επιβεβαίωση τους με τα δεδομένα των μοριακών δεικτών (Nicese et al., 1998). Παράλληλα οι γαλλικές και αμερικανικές ποικιλίες μπορεί να σχετίζονται, καθώς η γενετική βάση του αμερικανικού υλικού εμπλουτίστηκε με την εισαγωγή πολλών γαλλικών γονότυπων στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα (Dandekar et al., 2005; Nicese et al., 1998). Επίσης οι αποκλίσεις από τις γενεαλογίες ίσως να οφείλονται στο γεγονός ότι οι ISSR, για έναν συγκεκριμένο γονότυπο, μπορεί να μην ενισχύουν αλληλικά μεγέθη που να είναι 100% επαναλαμβανόμενα και για το λόγο αυτό όταν ο αντικειμενικός στόχος είναι η μελέτη γενεαλογιών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται καταλληλότεροι μοριακοί δείκτες, όπως οι SSR. Ωστόσο ακόμα και με τη χρήση των SSR έχουν παρατηρηθεί αποκλίσεις από τις γενεαλογίες (Ebrahimi et al., 2011).

#### ***1.4.3. Γενετική παραλλακτικότητα και γεωγραφικό μοτίβο ελληνικών επιλογών καρυδιάς***

Η μελέτη των 56 γονότυπων καρυδιάς υπέδειξε την ύπαρξη αρκετά υψηλής παραλλακτικότητας μεταξύ των ελληνικών επιλογών, η οποία ήταν υψηλότερη σε σχέση με την παραλλακτικότητα μεταξύ των διεθνών ποικιλιών, καθώς χαμηλότεροι συντελεστές γενετικής ομοιότητας βρέθηκαν μεταξύ των πρώτων σε σχέση με τους συντελεστές μεταξύ των δεύτερων. Την υπόθεση αυτή ενισχύει και το γεγονός ότι στο δενδρογράμμα οι περισσότερες ελληνικές επιλογές (20 από τις 27) τοποθετούνται εκτός της ομάδας A όπου βρίσκονται οι περισσότερες διεθνείς ποικιλίες. Ωστόσο η ύπαρξη ορισμένων ελληνικών γονότυπων (7 από τις 27) στην ομάδα A μπορεί να αποδοθεί στην ροή γονιδίων (gene flow) από τις καλλιεργούμενες που συμβαίνει από εμπορικές παραγωγικές καλλιέργειες. Οι (Foroni et al., 2007) απέδωσαν στη ροή γονιδίων, το γεγονός της ομαδοποίησης γονότυπων πληθυσμών καρυδιάς ‘Sorento’ με εμπορικές ποικιλίες διαφορετικής προέλευση όπως τις ‘Hartley’, ‘Parisienne’ και ‘Franquette’. Κατά μία άλλη προσέγγιση, σύμφωνα με τους

Bayazit et al. (2007) και Ebrahimi et al (2011), η ομαδοποίηση τοπικών γονότυπων με διεθνείς ποικιλίες πιθανόν να οφείλεται στην μεταφορά υλικού από τις περιοχές της Τουρκίας και του Ιράν προς τη Γαλλία και την Καλιφόρνια όπου αυτό το φυτικό είδος εισήχθη αργότερα. Αντίστοιχη υπόθεση μπορεί να γίνει και για το ελληνικό γενετικό υλικό, δεδομένου ότι η Ελλάδα θεωρείται από τις αρχαιότερες περιοχές καλλιέργειας της καρυδιάς μαζί με το Ιράν και την Τουρκία (Pollegioni et al., 2011).

Με βάση την AMOVA το ποσοστό της συνολικής γενετικής παραλλακτικότητας του ελληνικού γενετικού υλικού κατανέμεται εντός των γεωγραφικών περιοχών συλλογής παρά μεταξύ αυτών, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τη θέση των ελληνικών επιλογών στο δενδρόγραμμα, καθώς παρατηρείται ότι δεν μπορούν να διακριθούν ομάδες γονότυπων με βάση το γεωγραφικό τόπο συλλογής τους. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται κατά τη μελέτη πληθυσμών καρυδιάς από εννέα περιοχές της κεντρικής και νοτιοδυτικής Κίνας με SSR δείκτες όπου το μεγαλύτερο ποσοστό της συνολικής γενετικής παραλλακτικότητας υπάρχει εντός (18,6%) των περιοχών συλλογής παρά μεταξύ (81,4%) αυτών (Wang et al., 2008). Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και οι Pollegioni et al. (2011) οι οποίοι αναφέρουν ότι μόνο το 93% της παραλλακτικότητας κατανέμεται εντός των 14 Ιταλικών πληθυσμών καρυδιάς, ενώ μεταξύ επτά Ιρανικών πληθυσμών κατανεπήθηκε μόνο το 12% της παραλλακτικότητας (Karimi et al., 2010). Επίσης, σε μελέτες με βάση φαινοτυπικά χαρακτηριστικά γονότυπων από τέσσερις πληθυσμούς της Ισπανίας, η παραλλακτικότητα κατανεμήθηκε κυρίως εντός παρά μεταξύ των πληθυσμών (Diaz et al., 2005), ενώ κατά τη μελέτη 229 γονότυπων καρυδιάς από τέσσερις περιοχές της Ινδίας διακρίθηκαν 16 ομάδες στις οποίες συμμετείχαν γονότυποι από όλες τις περιοχές (Sharma and Sharma, 2001). Από όλα τα παραπάνω φαίνεται ότι η καρυδιά αποτελεί ένα φυτικό είδος το οποίο διατηρεί μεγάλη παραλλακτικότητα εντός ενός πληθυσμού, φαινόμενο το οποίο μπορεί να αποδοθεί στην σταυροεπικονίαση που χαρακτηρίζει το είδος (Karimi et al., 2010).

Με βάση της τιμές PhiPT, των πέντε περιοχών συλλογής ανά ζεύγη, παρατηρήθηκε γενικά ότι γονότυποι από πιο απομακρυσμένες γεωγραφικά περιοχές παραλλάσσουν περισσότερο γενετικά, σε σχέση με γονότυπους από πλησιέστερες περιοχές. Παράλληλα η μεγαλύτερη διαφοροποίηση της Κρήτης με τη Στερεά, την Ήπειρο και τη Μακεδονία πάρα με την Πελοπόννησο, πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι η πλησιέστερη, στην νησιωτική Κρήτη, ηπειρωτική περιοχή είναι η Πελοπόννησος. Σύμφωνα με τους Pollegioni et al. (2011), οι μεγαλύτερες γενετικές αποστάσεις των γονότυπων από τη Σικελία σε σχέση με τις υπόλοιπες Ιταλικές γεωγραφικές περιοχές μπορεί να οφείλονται στη γεωγραφική απομόνωση της νησιωτικής αυτής περιοχής. Έτσι μπορεί να υποθεθεί ότι η γεωγραφική μορφολογία του Ελλαδικού χώρου διαδραμάτισε κατά το παρελθόν, ή και μπορεί στο μέλλον να παίζει σημαντικό ρόλο, στην εξέλιξη και την παραλλακτικότητα της καρυδιάς.

#### **1.4.4. Συσχέτιση μεταξύ μοριακών και μορφολογικών δεδομένων του γενετικού υλικού της καρδιάς**

Σε έρευνες με δενδρώδη είδη έχουν αναφερθεί ποικίλοι βαθμοί συσχέτισης μεταξύ μορφολογικών χαρακτηριστικών και μοριακών δεικτών. Συγκεκριμένα υψηλή συσχέτιση μεταξύ των γενετικών σχέσεων που εκτιμήθηκαν με δείκτες ISSR και μορφολογικών χαρακτήρων βρέθηκαν στο είδος *Sonneratia* (Li and Chen, 2008), ενώ χαμηλή ή καθόλου συσχέτιση αναφέρονται στο κάσιους (*Anacardium occidentale* L.) (Archak et al., 2003) και την αμυγδαλιά (*Prunus dulcis* Mill.) (Sorkheh et al., 2007).

Στην παρούσα μελέτη τα δεδομένα μεταξύ μορφολογικών χαρακτηριστικών και ISSR δεν συσχετίστηκαν, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικά επίπεδα παραλλακτικότητας που εκτιμήθηκαν από τα δύο αυτά είδη δεκτών. Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και οι Ebrahimi et al. (2011) οι οποίοι δεν βρήκαν συσχέτιση μεταξύ μορφολογικών χαρακτηριστικών και SSR ή RAPD. Είναι γνωστό ότι οι μοριακοί δείκτες μετρούν την παραλλακτικότητα σε επίπεδο DNA η οποία δεν επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, σε αντίθεση με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που υπόκεινται στη φυσική επιλογή και η έκφρασή τους επηρεάζεται εν μέρει από το περιβάλλον. Επίσης η πολυγονιδιακή ρύθμιση των ποσοτικών χαρακτήρων είναι ένας ακόμη λόγος που μπορεί να επηρεάζει τη συσχέτιση μοριακών και μορφολογικών δεδομένων (Johns et al., 1997; Linhart et al., 1996; Terzopoulos and Bebeli, 2008).

#### **1.4.5. Συμπεράσματα**

Η τεχνική ISSR αποδείχθηκε ικανοποιητική στη μελέτη της εκτίμησης της γενετικής παραλλακτικότητας και των γενετικών σχέσεων γονότυπων καρδιάς. Οι ελληνικοί γονότυποι χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη παραλλακτικότητα, σε σχέση με τις διεθνείς ποικιλίες, γεγονός που καθιστά επιτακτική τη διατήρηση της παραλλακτικότητας αυτής, η οποία χάνεται λόγω της αναδιάρθρωσης των καλλιεργειών και την εισαγωγή των διεθνών ποικιλιών. Η διασπορά της παραλλακτικότητας κυρίως εντός των ελληνικών περιοχών καλλιέργειας σημαίνει ότι οι μελλοντικές δράσεις, που θα σχεδιαστούν για τη διατήρηση του ελληνικού γενετικού δυναμικού της καρδιάς, θα πρέπει να έχουν βασικό γνώμονα την προστασία των τοπικών πληθυσμών της.

## 1.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- Amel, S.-H., Khaled, C., Messaoud, M., Mohamed, M., Mokhtar, T.,** 2005. Comparative analysis of genetic diversity in two tunisian collections of fig cultivars based on Random Amplified Polymorphic DNA and Inter Simple Sequence Repeats fingerprints. *Genetic Resources and Crop Evolution* **52**, 563-573.
- Archak, S., Gaikwad, A.B., Gautam, D., Rao, E.V.V.B., Swamy, K.R.M., Karihaloo, J.L.,** 2003. Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India. *Genome* **46**, 362-369.
- Bayazit, S., Kazan, K., Gülbitti, S., Çevik, V., Ayanoglu, H., Ergül, A.,** 2007. AFLP analysis of genetic diversity in low chill requiring walnut (*Juglans regia* L.) genotypes from Hatay, Turkey. *Scientia Horticulturae* **111**, 394-398.
- Beede, R.H., Hasey, J.K.,** 1998. History of the walnut in California. In: Ramos, D.E., (ed.), Walnut production manual. *University of California Press, USA*, pp. 8-15.
- Camacho Villa, T.C.C., Maxted, N., Scholten, M., Ford-Lloyd, B.,** 2005. Defining and identifying crop landraces. *Plant Genetic Resources* **3**, 373-384.
- Dandekar, A., Leslie, C., McGranahan, G.,** 2005. *Juglans regia* Walnut. In: Litz, R.E. (Ed.), Biotechnology of fruit and nut crops. *CABI Publishing, Wallingford, UK*, pp. 307-323.
- Dangl, G.S., Woeste, K., Aradhya, M.K., Koehmstedt, A., Simon, C., Potter, D., Leslie, C.A., McGranahan, G.,** 2005. Characterization of 14 microsatellite markers for genetic analysis and cultivar identification of walnut. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **130**, 348-354.
- De Riek, J., Calsyn, E., Everaert, I., Van Bockstaele, E., De Loose, M.,** 2001. AFLP based alternatives for the assessment of Distinctness, Uniformity and Stability of sugar beet varieties. *Theoretical and Applied Genetics* **103**, 1254-1265.
- Diaz, R., Baoune, N., Ninot, A., Fernández-López, J., Aletà, N.,** 2005. Performance differences and genetic parameters of four local Spanish populations of *Juglans regia* in the north of Spain. *Acta Horticulturae* **705**, 103-109.
- Ebrahimi, A., Fatahi, R., Zamani, Z.,** 2011. Analysis of genetic diversity among some Persian walnut genotypes (*Juglans regia* L.) using morphological traits and SSRs markers. *Scientia Horticulturae* **130**, 146-151.
- Fjellstrom, R.G., Parfitt, D.E., McGranahan, G.H.,** 1994. Genetic relationships and characterization of persian walnut (*Juglans regia* L.) cultivars using Restriction

- Fragment Length Polymorphisms (RFLPs). *Journal of the American Society for Horticultural Science* **119**, 833-839.
- Erturk, U., Dalkilic, Z.**, 2011 Determination of genetic relationship among some walnut (*Juglans regia* L.) genotypes and their early-bearing progenies using RAPD markers. *Romanian Biotechnological Letters* **16**, 5944-5952.
- Fornari, B., Cannata, F., Spada, M., Malvolti, M.E.**, 1999. Allozyme analysis of genetic diversity and differentiation in European and Asiatic walnut (*Juglans regia* L.) populations. *Forest Genetics* **6**, 115-127.
- Froni, I., Rao, R., Woeste, K., Gallitelli, M.**, 2005. Characterisation of (*Juglans regia* L.) with SSR markers and evaluation of genetic relationships among cultivars and the 'Sorrento' landrace. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **80**, 49-53.
- Froni, I., Woeste, K., Monti, L., Rao, R.**, 2007. Identification of 'Sorrento' walnut using simple sequence repeats (SSRs). *Genetic Resources and Crop Evolution* **54**, 1081-1094.
- Germain, E., Aletà, N., Ninot, A., Rouskas, D., Zakinthinos, G., Gomes Pereira, J., Monastra, F., Limongelli, F.**, 1997. Prospections réalisées dans les populations de semis de noyer de l' Espagne, de Grèce, d' Italie et du Portugal: Caractérisation des populations et description en collections d'études des présélections issues de ces prospections. *Options Méditerranée* **16**, 7-40.
- Goulao, L., Monte-Corvo, L., Oliveira, C.M.**, 2001. Phenetic characterization of plum cultivars by high multiplex ratio markers: Amplified Fragment Length Polymorphisms and Inter-simple Sequence Repeats. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **126**, 72-77.
- Halldén, C., Hansen, M., Nilsson, N., Hjerdin, A., Säll, T.**, 1996. Competition as a source of errors in RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* **93**, 1185-1192.
- Johns, M.A., Skrotch, P.W., Nienhuis, J., Hinrichsen, P., Bascur, G., Munoz-Schick, C.**, 1997. Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. *Crop Science* **37**, 605-613.
- Kafkas, S., Ozkan, H., Sutyemez, M.**, 2005. DNA Polymorphism and assessment of genetic relationships in walnut genotypes based on AFLP and SAMPL markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **130**, 585-590.
- Karimi, R., Ershadi, A., Vahdati, K., Woeste, K.**, 2010 Molecular characterization of Persian walnut populations in Iran with microsatellite markers. *HortScience* **45**, 1403-1406.
- Laurentin, H., Karlovsky, P.**, 2007. AFLP fingerprinting of sesame (*Sesamum indicum* L.) cultivars: identification, genetic relationship and comparison of AFLP informativeness parameters. *Genetic Resources and Crop Evolution* **54**, 1437-1446.

- Leslie, C.A., McGranahan, G.H.**, 1998. The origin of the walnut. In: Ramos, D.E., (Ed.), Walnut Orchard Management. *University of California Press, USA*, pp. 3-7.
- Li, H., Chen, G.**, 2008. Genetic relationship among species in the genus *Sonneratia* in China as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Biochemical Systematics and Ecology* **36**, 392-398.
- Linhart, Y.B., Grant, M.C.**, 1996. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**, 237–277.
- Liu, W., Liu, D., Zhang, A., Feng, C., Yang, J., Yoon, J., Li, S.**, 2007. Genetic diversity and phylogenetic relationships among plum germplasm resources in China assessed with Inter-simple Sequence Repeat Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **132**, 619-628.
- Ma, Q., Zhang, J., Pei, D.**, 2011. Genetic analysis of walnut cultivars in China using Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **136**, 422-428.
- Manchester, S.R.**, 1989. Early history of the *Juglandaceae*. *Plant Systematics and Evolution* **162**, 231-250.
- Manning, W.E.**, 1978. The classification within the *Juglandaceae*. *Annals of the Missouri Botanical Gardens* **65**, 1058–1087.
- Nicese, F.P., Hormaza, J.I., McGranahan, G.H.**, 1998. Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes based on RAPD markers. *Euphytica* **101**, 199-206.
- Peakall, R.O.D., Smouse, P.E.**, 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**, 288-295.
- Pollegioni, P., Bartoli, S., Cannata, F., Malvolti, M.E.**, 2003. Genetic differentiation of four Italian walnut (*Juglans regia* L.) varieties by inter simple sequence repeat (ISSR). *Journal of Genetics and Breeding* **57**, 231-240.
- Pollegioni, P., Woeste, K., Olimpieri, I., Marandola, D., Cannata, F., Emilia Malvolti, M.**, 2011. Long-term human impacts on genetic structure of Italian walnut inferred by SSR markers. *Tree Genetics & Genomes* **7**, 707-723.
- Potter, D., Gao, F., Aiello, G., Leslie, C., McGranahan, G.**, 2002. Intersimple Sequence Repeat Markers for fingerprinting and determining genetic relationships of walnut (*Juglans regia*) cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **127**, 75-81.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalski, A.**, 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* **2**, 225-238.



- Reddy, P.M., Sarla, N., Siddiq, E.A.,** 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* **128**, 9-17.
- Prevost, A., Wilkinson, M.J.,** 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* **98**, 107-112.
- Rohlf, F.J.,** 1998. NTSYS-Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. *Exeter Publishing, New York, USA*.
- Rouskas, D., Katranis, N., Zakyntinos, G., Isaakidis, A.,** 1997. Walnuts (*J. regia* L.) seedlings selection in Greece. *Acta Horticulturae* **442**, 112-116.
- Rouskas, D., Zakyntinos, G.,** 2001. Preliminary evaluation of seventy walnut (*Juglans regia* L.) seedlings selection in Greece. *Acta Horticulturae* **544**, 61-72.
- Ruiz-Garcia, L., Lopez-Ortega, G., Denia, A.F., Tomas, D.F.,** 2011. Identification of a walnut (*Juglans regia* L.) germplasm collection and evaluation of their genetic variability by microsatellite. *Spanish Journal of Agricultural Research* **9**, 179-192.
- Saghai-Marooif, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A., Allard, R.W.,** 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 8014-8018.
- Sharma, O.C., Sharma, S.D.,** 2001. Genetic divergence in seedling trees of Persian walnut (*Juglans regia* L.) for various metric nut and kernel characters in Himachal Pradesh. *Scientia Horticulturae* **88**, 163-171.
- Solar, A., Ivancic, A., Stampar, F., Hudina, M.,** 2002. Genetic resources for walnut (*Juglans regia* L.) improvement in Slovenia. Evaluation of the largest collection of local genotypes. *Genetic Resources and Crop Evolution* **49**, 491-501.
- Sorkheh, K., Shiran, B., Gradziel, T., Epperson, B., Martínez-Gómez, P., Asadi, E.,** 2007. Amplified fragment length polymorphism as a tool for molecular characterization of almond germplasm: genetic diversity among cultivated genotypes and related wild species of almond, and its relationships with agronomic traits. *Euphytica* **156**, 327-344.
- Terzopoulos, P.J., Bebeli, P.J.,** 2008. DNA and morphological diversity of selected Greek tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces. *Scientia Horticulturae* **116**, 354-361.
- Terzopoulos, P.J., Kolano, B., Bebeli, P.J., Kaltsikes, P.J., Metzidakis, I.,** 2005. Identification of *Olea europaea* L. cultivars using inter-simple sequence repeat markers. *Scientia Horticulturae* **105**, 45-51.
- Tukele, W., McGranahan, G.H.,** 1994. The walnut germplasm collection at the University of California, Davis: a description of the collection and a history of the breeding program of Eugene F. Serr and Harold I. Forde. *University of California, Genetic Resources Conservation Program Report No. 13*.

- Vijayan, K., Tikader, A., Kar, P., Srivastava, P., Awasthi, A., Thangavelu, K., Saratchandra, B.,** 2006. Assessment of genetic relationships between wild and cultivated mulberry (*Morus*) Species using PCR based markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* **53**, 873-882.
- Vyas, D., Sharma, S.K., Sharma, D.R.,** 2003. Genetic structure of walnut genotype using leaf isozymes as variability measure. *Scientia Horticulturae* **97**, 141-152.
- Wang, H., Pei, D., Gu, R.S., Wang, B.Q.,** 2008. Genetic Diversity and structure of walnut populations in central and southwestern China revealed by microsatellite markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **133**, 197-203.
- Yap, V., Nelson, R.J.,** 1996. WinBoot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. *International Rice Research Institute, Manila, Phillipines.* Available from <http://irri.org/science/software/winboot.asp> (on line).
- Zeneli, G., Kola, H., Dida, M.,** 2005. Phenotypic variation in native walnut populations of Northern Albania. *Scientia Horticulturae* **105**, 91-100.
- Zhang, R., Zhu, A., Wang, X., Yu, J., Zhang, H., Gao, J., Cheng, Y., Deng, X.,** 2010 Development of *Juglans regia* SSR markers by data mining of the EST database *Plant Molecular Biology Reporter* **28**, 646-653.



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

---

*Επίδραση των συνθηκών συντήρησης, επί των ποιοτικών χαρακτηριστικών των αποξηραμένων καρπών τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς*



## Περίληψη

Μεταξύ των φυτικών τροφών και ιδιαίτερα μεταξύ των ξηρών καρπών, τα καρύδια έχουν πολύ υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), συγκέντρωση ολικών φαινολικών (TP) και πολύ-ακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) ιδιαίτερα  $\omega$ -3 και  $\omega$ -6, γεγονός που τα καθιστά εξαιρετική πηγή αυτών των πολύτιμων θρεπτικών συστατικών. Συνήθης πρακτική κατά τη διάθεση των καρυδιών αποτελεί η μακρά συντήρηση των αποξηραμένων σπερμάτων καθιστώντας τη μελέτη και βελτίωση των συνθηκών συντήρησης πολύ σημαντική. Οι περισσότερες μελέτες έχουν εστιάσει στην επίδραση των συνθηκών συντήρησης (θερμοκρασία, σχετική υγρασία, συγκέντρωση O<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα συντήρησης, φως) επί των ποιοτικών χαρακτηριστικών με βάση την αντίληψη του καταναλωτή (χρώμα, οξύτητα, πτητικές ουσίες). Ωστόσο, ελάχιστα δεδομένα υπάρχουν σχετικά με την επίδραση των συνθηκών συντήρησης επί των αντιοξειδωτικών και των λιπαρών οξέων (FA). Παράλληλα, στις περισσότερες έρευνες το φυτικό υλικό που έχει χρησιμοποιηθεί είναι άγνωστης ποικιλίας ή/και άγνωστων μετά-συλλεκτικών χειρισμών (χρόνος συγκομιδής, αποφλοιώση, αποξήρανση), από τη συγκομιδή μέχρι τη συντήρηση.

Σκοπός του παρόντος κεφαλαίου ήταν η μελέτη των συνθηκών συντήρησης (χρόνος, θερμοκρασία και ατμόσφαιρα συντήρησης) επί του χρώματος, των TP και TAC (εκτιμώμενη με τις μεθόδους FRAP και DPPH) των σπερμάτων παράλληλα με το προφίλ των FA και τους δείκτες υδρόλυσης (FFA, ελεύθερα λιπαρά οξέα) και οξειδωσης (PV, βαθμός υπεροξειδίων) του καρυδέλαιου. Οι μεταβολές των παραπάνω χαρακτηριστικών και οι πιθανές σχέσεις μεταξύ τους μελετήθηκαν σε σπέρματα τριών διεθνών ποικιλιών (Chandler, Hartley, Franquette) και μιας ελληνικής (Ιόλη) με σκοπό να διερευνηθεί και η επίδραση του παράγοντα ποικιλία.

Τα καρύδια συγκομίστηκαν σε ώριμο στάδιο, αποφλοιώθηκαν και αποξηράθηκαν ήπια (36° C για 24 h). Κατόπιν απομακρύνθηκε το κέλυφος, τα σπέρματα τοποθετήθηκαν σε συσκευασίες υλικού πολυαιθυλένιο || πολυαμίδιο (πάχος 80 μm) και οι συσκευασίες πληρώθηκαν με ξηρό αέρα (air) ή N<sub>2</sub> ή CO<sub>2</sub>. Τα καρύδια από τις τρεις ατμόσφαιρες συσκευασίας (air, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) αποθηκεύθηκαν σε 1° C ή 20° C για χρονικό διάστημα έως 12 mo.

Πριν τη συντήρηση, η 'Chandler' είχε τα υψηλότερα επίπεδα PUFA και λινολενικού οξέως (LN), η 'Hartley' τα υψηλότερα επίπεδα κορεσμένων λιπαρών οξέων (SFA), η 'Franquette' υψηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικών (TP, TAC), ενώ η 'Ιόλη' παρουσίασε το πιο ανοιχτόχρωμο σπέρμα και τα υψηλότερα επίπεδα μόνο-ακόρεστων λιπαρών οξέων (MUFA) και ελαϊκού οξέως (OL). Σε όλες τις ποικιλίες προσδιορίστηκαν επίσης τα λιπαρά οξέα μυριστικό (MY), παλμιτικό (PA), στεαρικό (ST), βαχενικό (VA), λινελαϊκό (LL), αραχιδικό (AR) και γονδοϊκό (GO). Κατά τη διάρκεια της συντήρησης στις συσκευασίες που

είχαν πληρωθεί με  $N_2$  και  $CO_2$  παρατηρήθηκε μια προοδευτική αύξηση της συγκέντρωσης του  $O_2$  ή οποία ήταν πιο έντονη κατά τη συντήρηση στους  $20^\circ C$ , ενώ στις συσκευασίες που είχαν πληρωθεί με αέρα η συγκέντρωση του  $O_2$  παρέμεινε σταθερή σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης και στις δυο θερμοκρασίες. Κατά τη συντήρηση παρατηρήθηκε προοδευτικό καφέτιασμα των καρυδιών που καταγράφηκε με μειωμένες τιμές των παραμέτρων  $L^*$ ,  $h^o$  και Whiteness index (WI), ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων των TP (μειώσεις ~12-59%) και TAC (μειώσεις ~10-50%). Οι παραπάνω μεταβολές ήταν εντονότερες με την πάροδο του χρόνου συντήρησης. Όσον αφορά το καρυδέλαιο, πριν τη συντήρηση ήταν εξαιρετικής σύστασης για όλες τις ποικιλίες με πολύ υψηλό ποσοστό PUFA και πολύ χαμηλά επίπεδα FFA και PV. Σε σχέση με τις αρχικές τιμές, η δωδεκάμηνη συντήρηση προκάλεσε δραματική αύξηση των επιπέδων του PV (κατά ~200-φορές), αλλά μικρότερη αύξηση των FFA (κατά ~3-φορές). Το ποσοστό των ακόρεστων λιπαρών οξέων (UFA) μειώθηκε κατά τη συντήρηση (μειώσεις ~2-12%), μεταβολές οι οποίες οφείλονταν σε απώλειες MUFA (μέση μείωση ~7%) και των PUFA (μέση μείωση ~7%), καθώς δεν παρατηρήθηκε μεταβολή του ποσοστού των SFA. Τα κύρια FA του καρυδέλαιου, OL, LL ( $\omega$ -6) και LN ( $\omega$ -3) παρουσίασαν τις μεγαλύτερες απώλειες οι οποίες ήταν της τάξεως του ~7%, ~7% και ~4% κατά μέσο όρο, αντίστοιχα.

Η χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης ( $1^\circ C$ ) και η συσκευασία υπό  $N_2$  ή  $CO_2$  περιόρισαν το καφέτιασμα, τις απώλειες των TP, TAC, UFA, MUFA, PUFA, OL, LL και LN, και τις αυξήσεις των FFA και PV. Μάλιστα, η θετική επίδραση των δύο αυτών παραγόντων ήταν προσθετική. Παρόμοια συμπεριφορά είχαν οι τέσσερις ποικιλίες κατά τη συντήρηση με μόνο μικρές ποσοτικές διαφοροποιήσεις να παρατηρούνται. Οι αναλύσεις συσχέτισης και κυρίων συνιστωσών (PCA) έδειξαν στενή σχέση μεταξύ των αντιοξειδωτικών παραμέτρων (TP, FRAP, DPPH) αλλά και μεταξύ TP και καφετιάσματος των σπερμάτων. Παράλληλα, παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στο τάγγισμα (FFA, PV) και τα UFA, PUFA, LL. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι τα χαρακτηριστικά των καρυδιών που τα καθιστούν εξαιρετική τροφή από την άποψη της θρεπτικής αξίας είναι υπεύθυνα και για την υποβάθμιση της ποιότητας του προϊόντος σύμφωνα με την αντίληψη του καταναλωτή. Οι μεγαλύτερες απώλειες αντιοξειδωτικών σε σχέση με τις απώλειες λιπαρών οξέων (UFA), σε συνδυασμό με τις σχέσεις που βρέθηκαν μεταξύ τους, υπέδειξαν έναν πιθανό προστατευτικό ρόλο των ενδογενών αντιοξειδωτικών επί της οξείδωσης των FA του καρυδέλαιου.

Μέχρι τώρα η έρευνα που αφορούσε τη συντήρηση των καρυδιών είχε επικεντρωθεί κυρίως σε ποιοτικά χαρακτηριστικά σύμφωνα με την αντίληψη του καταναλωτή. Από τα παρόντα αποτελέσματα φάνηκε ότι ιδιαίτερη έμφαση θα πρέπει να δίνεται και στην ποιότητα με βάση θρεπτικά χαρακτηριστικά, επί της οποίας θετική επίδραση μπορεί να έχει η συντήρηση στον  $1^\circ C$  ή/και η συσκευασία υπό  $N_2$  ή  $CO_2$ .

## 2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 2.1.1. Γενική σύσταση καρυδιού

Στο εδώδιμο μέρος του καρυδιού (σπέρμα) μετά την αποξήρανση η περιεκτικότητα σε υγρασία πρέπει να κυμαίνεται από 3-13% (w/w). Στην ξηρά ουσία το λίπος (καρυδέλαιο) αποτελεί το κύριο συστατικό καταλαμβάνοντας σε ορισμένες περιπτώσεις έως και το 72% του ξηρού βάρους (Prasad, 2003). Μετά το καρυδέλαιο, από ποσοτική άποψη, έπονται η πρωτεΐνη (~13-18%) και οι υδατάνθρακες (~4-14%) (Πίνακας 2.1). Τα σπέρματα είναι καλή πηγή βιταμινών (A, C, K, θειαμίνης, ριβοφλαβίνης, νιασίνης), τοκοφερολών ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -) και θρεπτικών στοιχείων (P, K, Mg, Ca, Fe) (Πίνακας 2.1). Επίσης τα καρύδια περιέχουν φαινολικές ενώσεις οι οποίες αν και από άποψη συγκέντρωσης δεν ξεπερνούν το 2% (w/w) της ξηράς ουσίας του σπέρματος, καθιστούν τα καρύδια εξαιρετική πηγή φαινολικών, καθώς η συγκέντρωση αυτή είναι από τις υψηλότερες μεταξύ των φυτικών προϊόντων (Kornsteiner et al., 2006; Yang et al., 2009). Παράλληλα τα σπέρματα της καρυδιάς έχουν εξαιρετικής σύστασης καρυδέλαιο το οποίο χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλό ποσοστό πολύ-ακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) ιδιαίτερα  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 λιπαρά οξέα (Amaral et al., 2003; Fasina et al., 2008; Gan et al., 2005; Kris-Etherton et al., 2000; Li et al., 2007; Pereira et al., 2008). Ο συνδυασμός των δυο τελευταίων χαρακτηριστικών (φαινολικά και σύσταση καρυδέλαιου) καθιστούν τα καρύδια μοναδικά μεταξύ των ξηρών καρπών, αλλά και των φυτικών προϊόντων από την άποψη της σύστασης (Halvorsen et al., 2006).

Οι περιεκτικότητες των συστατικών στα σπέρματα παρουσιάζουν αξιοσημείωτες διακυμάνσεις μεταξύ των διαφόρων μελετών που έχουν γίνει. Αυτές οι διαφορές έχουν αποδοθεί στους διαφορετικούς γονοτύπους των ποικιλιών που εξετάστηκαν, σε διαφορετικές καλλιεργητικές συνθήκες, χρόνους συγκομιδής,

**Πίνακας 2. 1.** Γενική σύσταση, θρεπτικά στοιχεία και βιταμίνες του σπέρματος του καρυδιού (Ανασκόπηση από Feinberg et al., 1987; Lambertsen et al., 1962; Lavedrine et al., 1997; Pereira et al., 2008; Prasad, 2003; Souci et al., 1994; Venkatachalam and Sathe, 2006).

Γενική σύσταση	Ανά 100 g	
Υγρασία (g)	2,7-	6,8
Πρωτεΐνη (g)	13,6-	18,1
Λίπος (g)	65,21-	72,14
Τέφρα (g)	1,78-	4,23
Υδατάνθρακες (g)	3,88-	13,71
Ίνες (g)	3,1-	6,7
Σάκχαρα (g)	2,06-	2,61
Θρεπτικά στοιχεία		
Ca (mg)	37-	98
Fe (mg)	2,91-	5,93
Mg (mg)	158-	278
P (mg)	346-	385
K (mg)	357-	500
Na (mg)	0,134-	2,000
Zn (mg)	1,948-	3,613
Cu (mg)	1,41-	2,857
Mn (mg)	3,414-	17,59
Sr (mg)	0,16-	0,537
Rb (mg)	0,356-	2,607
Al (mg)	0,102-	0,525
Cr (mg)	0,255-	0,692
Se ( $\mu$ g)	1,0-	4,9
Βιταμίνες		
C (mg)	0,4-	8,5
Θειαμίνη (mg)	0,22-	0,45
Ριβοφλαβίνη (mg)	0,1-	0,16
Νιασίνη (mg)	0,7-	1,125
A (IU)	20-	300
$\alpha$ -τοκοφερόλη (mg)	0,7-	4,05
$\beta$ -τοκοφερόλη (mg)	0,15-	0,375
$\gamma$ -τοκοφερόλη (mg)	20,83-	31,12
$\delta$ -τοκοφερόλη (mg)	1,89-	4,11
K ( $\mu$ g)	0,9-	2,7



περιοχές καλλιέργειας και μετά-συλλεκτικούς χειρισμούς (Amaral et al., 2003; Bujdos et al., 2010; Colaric et al., 2005; Kornsteiner et al., 2006; López et al., 1995; Martínez et al., 2010; Pereira et al., 2008).

## **2.1.2. Φαινολικά συστατικά και αντιοξειδωτική ικανότητα**

### **2.1.2.1. Γενικά περί αντιοξειδωτικών και των ιδιοτήτων τους**

Όσον αφορά τα φυτικά προϊόντα και τα τρόφιμα, ως αντιοξειδωτικό θεωρείται κάθε ουσία η οποία σε μικρές ποσότητες είναι ικανή να αποτρέψει ή να καθυστερήσει την οξείδωση ενός ευοξειδωτού υποστρώματος (Halliwell, 1990), ενώ στα βιολογικά συστήματα αντιοξειδωτικό θεωρείται οποιοδήποτε μόριο του οποίου η παρουσία σε συγκεντρώσεις σημαντικά χαμηλότερες ενός ευοξειδωτού υποστρώματος, καθυστερεί σημαντικά ή/και αποτρέπει την οξείδωση του (Chirault, 1962). Οι παραπάνω ορισμοί καλύπτουν όλες τις ενώσεις που μπορούν να οξειδωθούν από τις ελεύθερες ρίζες, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που παρεμποδίζουν συγκεκριμένα οξειδωτικά ένζυμα ή αντιδρούν με οξειδωτικές ενώσεις πριν αυτές καταστρέψουν κρίσιμα βιολογικά μόρια (Scott, 1997).

Όλοι οι φυτικοί ιστοί διαθέτουν αντιοξειδωτικά συστήματα για την προστασία τους από τη δράση των ελευθέρων ριζών και ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species), στα οποία συμπεριλαμβάνονται λιποδιαλυτές αντιοξειδωτικές ενώσεις (τοκοφερόλες, καροτινοειδή), υδατοδιαλυτές αντιοξειδωτικές ενώσεις (γλουταθειόνη, ασκορβικό οξύ), καθώς και διάφορα ένζυμα (υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση, ασκορβική υπεροξειδάση). Τα τελευταία χρόνια μελετώνται ιδιαίτερα οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φαινολικών ενώσεων (Bravo, 1998; Robards et al., 1999), καθώς ορισμένες φαινολικές ενώσεις φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από πολλά άλλα αντιοξειδωτικά (Cao et al., 1998; Vinson et al., 1995; von Gadow et al., 1997). Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν χαρακτηριστικό ποιότητας των φυτικών προϊόντων, ενώ παράλληλα επηρεάζουν και άλλα ποιοτικά χαρακτηριστικά (Manzocco et al., 2001; Tomás-Barberán and Espín, 2001).

### **2.1.2.2. Φαινολικά και αντιοξειδωτική ικανότητα καρυδιών**

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω τα επίπεδα των φαινολικών στα καρύδια είναι από τα υψηλότερα μεταξύ των διαφόρων φυτικών προϊόντων. Η εκτίμηση των επιπέδων των φαινολικών βασίζεται είτε στην μέτρηση των ολικών φαινολικών (TP) με χημικές-φωτομετρικές μεθόδους ή στην μέτρηση μεμονωμένων φαινολικών συστατικών με χρωματογραφικές μεθόδους. Στο παρόν κεφάλαιο θα γίνει αναφορά στα TP καθώς τα μεμονωμένα φαινολικά θα αποτελέσουν αντικείμενο του τρίτου κεφαλαίου.

Τα επίπεδα των TP και στα καρύδια έχουν μελετηθεί σε αρκετές ερευνητικές εργασίες στις οποίες παρατηρείται μεγάλη διακύμανση των τιμών τους (Πίνακας 2. 2). Ωστόσο, στις περισσότερες μελέτες οι καρποί ήταν άγνωστης ποικιλίας ή/και άγνωστων μετά-συλλεκτικών χειρισμών από την συγκομιδή έως τη δειγματοληψία. Παράλληλα, σε πολλές έρευνες αναφέρεται ότι τα φαινορικά συνεισφέρουν σημαντικά στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) των καρυδιών (Cerda et al., 2004; Fukuda et al., 2003; Li et al., 2006).

Στη βιβλιογραφία, οι τιμές που αφορούν την TAC των καρυδιών παρουσιάζουν, μεταξύ των μελετών, ακόμα μεγαλύτερη διακύμανση από αυτές των TP. Το παραπάνω οφείλεται στο γεγονός ότι η εκτίμηση της TAC μπορεί να γίνει με διάφορες μεθόδους, καθεμία από τις οποίες εκτιμά διαφορετική αντιοξειδωτική ιδιότητα (Arak et al., 2007; Huang et al., 2007; Prior et al., 2005). Ανεξάρτητα όμως από το εύρος των επιπέδων των TP και της TAC, οι τιμές τους καθιστούν τα καρύδια στις υψηλότερες θέσεις μεταξύ των φυτικών προϊόντων από την άποψη των αντιοξειδωτικών (Açar et al., 2009; Blomhoff et al., 2006; Halvorsen et al., 2002; Halvorsen et al., 2006; Pellegrini et al., 2006; Wu et al., 2004; Yang et al., 2009).

**Πίνακας 2. 2.** Βιβλιογραφική ανασκόπηση ολικών φαινολικών (TP) και ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) καρυδιών.

TP		TAC		Πηγή	
Τιμή	Έκφραση <sup>†</sup>	Μέθοδος	Τιμή	Έκφραση <sup>†</sup>	
25,0-	mg GAE g <sup>-1</sup> ††	DPPH †††	120-	μmol TAE g <sup>-1</sup> ††	Abe et al. (2010)
		ABTS	224-	μmol TAE g <sup>-1</sup>	Açar et al. (2009)
16,0-	mg GAE g <sup>-1</sup>				Anderson et al. (2001)
5,4- 5,9	mg GAE g <sup>-1</sup>	ABTS	91- 95	μmol TAE g <sup>-1</sup>	Arcan and Yemenicioglu (2009)
10,7-	mg GAE g <sup>-1</sup>	FRAP	115-	μmol TAE g <sup>-1</sup>	Arranz et al. (2008)
		ABTS	154-	μmol TAE g <sup>-1</sup>	
		ORAC	187-	μmol TAE g <sup>-1</sup>	
		DPPH	14,3-	EC <sub>50</sub> g g <sup>-1</sup> DPPH	
9,3- 31,8	mg GAE g <sup>-1</sup>				Bakkalbaşı et al. (2012)
		FRAP	108- 333	μmol TAE g <sup>-1</sup>	Blomhoff et al. (2006)
7,1-	mg CE g <sup>-1</sup>				Gunduc and El (2003)
		FRAP	180- 250		Halvorsen et al. (2002)
		FRAP	130-		Halvorsen et al. (2006)
10,2- 20,5	mg GAE g <sup>-1</sup>				Kornsteiner et al. (2006)
16,3- 25,6	mg GAE g <sup>-1</sup>	DPPH	14- 92	μg BHT g <sup>-1</sup>	Labuckas et al. (2008)
		FRAP	454-	μmol Fe <sup>2+</sup> g <sup>-1</sup>	Pellegrini et al. (2006)
		TRAP	32-	μmol TAE g <sup>-1</sup>	
		TEAC	137-	μmol TAE g <sup>-1</sup>	
59,0- 95,0	mg GAE g <sup>-1</sup>				Pereira et al. (2008)
15,5-	mg GAE g <sup>-1</sup>	ABTS	9-	mg GAE g <sup>-1</sup>	Salcedo et al. (2010)
		DPPH	13-	mg GAE g <sup>-1</sup>	
15,6-	mg GAE g <sup>-1</sup>	ORAC	135-	μmol TAE g <sup>-1</sup>	Wu et al. (2004)
13,6-	mg GAE g <sup>-1</sup>	TOSC	450-	mmol AAE g <sup>-1</sup>	Yang et al. (2009)

† Όπου ήταν δυνατό έγινε μετατροπή των τιμών και των εκφράσεων ώστε να είναι συγκρίσιμες μεταξύ των διαφόρων μελετών και με τις τιμές της παρούσας μελέτης.

†† GAE, ισοδύναμα γαλλικού οξέως; CE, ισοδύναμα κατεχίνης; TAE, ισοδύναμα trolox οξέως; AAE, ισοδύναμα ασκορβικού οξέως.

††† DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS, 2,2-Azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid); FRAP, Ferric Reducing Antioxidant Power; ORAC, Oxygen Radical Absorbance Capacity; TEAC, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; TOSC, Total Oxyradical Scavenging Capacity; TRAP, Total Radical-trapping Antioxidant Parameter.

### 2.1.3. Σύσταση καρυδέλαιου

Όπως αναφέρθηκε, το καρυδέλαιο αποτελεί από ποσοτικής άποψης το κύριο συστατικό του σπέρματος. Το καρυδέλαιο έχει εξαιρετική σύσταση καθώς έχει μηδενικά επίπεδα χοληστερόλης, χαμηλό ποσοστό κορεσμένων λιπαρών οξέων (SFA) και πολύ υψηλά ποσοστά ακόρεστων λιπαρών οξέων (UFA). Παράλληλα η σύσταση του κλάσματος των UFA αποτελείται κυρίως από ουσιώδη πολύ-ακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) και δευτερευόντως

από μόνο-ακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA). Στους Πίνακες 2.3-2.5 παρουσιάζεται η ποσοστιαία σύσταση του καρυδέλαιου όσον αφορά τα κλάσματα των λιπαρών οξέων (SFA, UFA, MUFA, PUFA) και τα μεμονωμένα λιπαρά οξέα (FA).

Τα κύρια SFA του καρυδέλαιου είναι το παλμιτικό (PA) και το στεαρικό (ST), ενώ το κύριο MUFA είναι το ελαϊκό (OL). Στα PUFA ανήκουν το λινελαϊκό (LL) και το  $\alpha$ -λινόλενικό (LN). Η εξαιρετική σύσταση του καρυδέλαιου αποδίδεται στην μεγάλη περιεκτικότητά του σε LL ( $\omega$ -6) και δευτερευόντως σε LN ( $\omega$ -3) (Πίνακας 2.4). Τα PUFA συμμετέχουν σε πολλές ζωτικές διεργασίες του μεταβολισμού των κυττάρων (Gurr, 1999). Τα LL και LN θεωρούνται ουσιώδη FA (essential fatty acids), καθώς δεν μπορούν να συντεθούν από τον ανθρώπινο οργανισμό και η λήψη αυτών των συστατικών μπορεί να γίνει μόνο μέσω της διαίτας (Gogus and Smith, 2010; Gurr, 1999; Simopoulos, 2008).

**Πίνακας 2. 3.** Ποσοστιαία περιεκτικότητα κλασμάτων λιπαρών οξέων (FA) του καρυδέλαιου σε κορεσμένα (SFA) ακόρεστα (UFA), μόνο-ακόρεστα (MUFA) και πολύ-ακόρεστα (PUFA) (Ανασκόπηση από Amaral et al., 2003; Bakkalbasi et al., 2012; Crews et al., 2005; Dogan and Akgul, 2005; Fasina et al., 2008; Gan et al., 2005; Hanusa et al., 2008; Li et al., 2007; López et al., 1995; Martínez et al., 2006; Martínez et al., 2010; Martínez and Maestri, 2008; Muradoglu et al., 2010; Ozcan and Koyuncu, 2005; Ozcan et al., 2010; Pereira et al., 2008; Rabrenovic et al., 2008; Rabrenovic et al., 2011; Venkatachalam and Sathe, 2006).

Κλάσματα FA (%)					
SFA		UFA			
		MUFA		PUFA	
4,8-	11,8	13,0-	30,0	61,8-	78,2

Εκτός των παραπάνω FA στο καρυδέλαιο έχουν ταυτοποιηθεί και άλλα τα οποία βρίσκονται σε μικρότερα ποσοστά (Πίνακας 2. 5). Επίσης στο καρυδέλαιο έχουν βρεθεί ίχνη μη κοινών FA με περιττό αριθμό ατόμων άνθρακα ( $C_{15}$ ,  $C_{17}$ ,  $C_{19}$ ,  $C_{21}$ ,  $C_{23}$ ) (Amaral et al., 2003; Li et al., 2007) όπως και ορισμένα κυκλοπρόπυλ-FA (Hanusa et al., 2008).

Σε μελέτες που αφορούν φυτικά έλαια από διάφορα είδη (αμυγδαλιά, αραχίδα, ελιά, ηλιάνθος, καλαμπόκι, κάσιους, μακαντάμια, πεκάν, σόγια, σουσάμι, φιστικιά, φουντούκια) το καρυδέλαιο βρίσκεται στην κορυφή της λίστας όσον αφορά την περιεκτικότητά του σε PUFA, LL και LN (Fasina et al., 2008; Gan et al., 2005; Kris-Etherton et al., 2000; Venkatachalam and Sathe, 2006). Για το λόγο αυτό σε συνδυασμό με την υψηλή ελαιοπεριεκτικότητα του σπέρματος το καρύδι θεωρείται εξαιρετική πηγή ουσιωδών FA.

**Πίνακας 2. 4.** Ποσοστιαία περιεκτικότητα των κύριων λιπαρών οξέων (FA) του καρυδέλαιου (Ανασκόπηση όπως Πίν. 2.3).

FA (%)				
Παλμιτικό (PA)	Στεαρικό (ST)	Ελαϊκό (OL)	Λινελαϊκό (LL)	Λινολενικό (LN)
$C_{16:0}$	$C_{18:0}$	$C_{18:1 n-9}$	$C_{18:2 n-9,12}$	$C_{18:3 n-9,12,15}$
3,6- 8,1	0,9- 3,7	12,7- 40,2	43,9- 66,5	6,1- 18,6

**Πίνακας 2. 5.** Ποσοστιαία περιεκτικότητα των δευτερευόντων λιπαρών οξέων (FA) του καρυδέλαιου (Ανασκόπηση όπως Πίν. 2.3).

FA (%)				
Μυριστικό (MY)	Παλμιτελαϊκό (PO)	Βαχενικό (VAC)	Αραχιδικό (AR)	Γονδοϊκό (GO)
C <sub>14:0</sub>	C <sub>16:1 n-9</sub>	C <sub>18:1 n-11</sub>	C <sub>20:0</sub>	C <sub>20:1 n-11</sub>
0,02- 0,66	0,05- 1,69	0,76- 1,53	0,05- 0,31	0,10- 0,30

#### 2.1.4. Ποιοτικά χαρακτηριστικά καρυδιών σύμφωνα την αντίληψη του καταναλωτή

Εκτός από τα χαρακτηριστικά που ορίζουν την ποιότητα του καρπού από την άποψη της θρεπτικής αξίας-σύστασης, υπάρχουν και ορισμένα που ορίζουν την ποιότητα του καρπού σύμφωνα με την αντίληψη του καταναλωτή.

Το χρώμα αποτελεί ένα από τα κύρια ποιοτικά χαρακτηριστικά του καρυδιού (Kader and Thompson 2002; Koyuncu et al., 2003; Mexis et al., 2009) και ταξινομείται από εξαιρετικά ανοιχτόχρωμο-φωτεινό (extra light) έως καφέ-κεχριμπαρένιο (amber) (IPGRI, 1994). Το χρώμα εξαρτάται κυρίως από την ποικιλία και τους μετά-συλλεκτικούς χειρισμούς από την συγκομιδή έως τη διάθεση του προϊόντος (Hendricks et al., 1998; Kader and Thompson 2002; Koyuncu et al., 2003). Στις περισσότερες μελέτες η εκτίμηση του χρώματος των καρυδιών έχει γίνει μακροσκοπικά με οπτική παρατήρηση (Colaric et al., 2006; Germain et al., 1997; Koyuncu et al., 2003; Sinensio and Moneta, 1997; Warmund et al., 2009). Υπάρχουν περιορισμένα στοιχεία στη βιβλιογραφία σχετικά με το χρώμα των καρυδιών εκτιμώμενο με αντικειμενική μέθοδο. Σε μελέτες με καρύδια άγνωστης ποικιλίας αναφέρονται τιμές του  $L^*$  ~46 (Wang et al., 2007), και ~40 (Crowe and White, 2003), ενώ σύμφωνα με τους Warmund et al., (2009), ένα άθροισμα των τιμών των  $L^*$ ,  $h^o$  και  $C^*$  μεγαλύτερο της τιμής 155 αντιστοιχεί σε ανοιχτόχρωμα σπέρματα (light kernels) καλής ποιότητας.

Το τάγγισμα των καρυδιών είναι ένα ακόμα χαρακτηριστικό ποιότητας σύμφωνα με την αντίληψη του καταναλωτή. Το τάγγισμα μπορεί να χαρακτηριστεί ως υδρολυτικό ή/και οξειδωτικό. Το υδρολυτικό τάγγισμα προκαλείται με την αποδέυμευση FA μέσω υδροθερμικής (hydrothermal) ή/και ενζυμικής (με δράση της λιπάσης) υδρόλυσης των τριακυλγλυκερολών (Robards et al., 1988; Wang et al., 2001). Από την άλλη, το οξειδωτικό τάγγισμα, προκαλείται από την οξείδωση των FA οδηγώντας στον σχηματισμό, σε πρώτο στάδιο, υπεροξειδίων (Frankel, 1991; Mexis et al., 2009; Paradiso et al., 2010; Robards et al., 1988; St. Angelo et al., 1996). Η εκτίμηση του ταγγίσματος μπορεί να γίνει είτε με οργανοληπτική δοκιμή είτε με την μέτρηση των ελεύθερων FA (FFA) και με το βαθμό υπεροξειδίων (PV) (αντικειμενικές μέθοδοι). Για τα καρύδια υπάρχουν πολλά δεδομένα σχετικά με τα FFA και το PV δεδομένου ότι λόγω του υψηλού ποσοστού καρυδέλαιου του καρπού είναι ευπαθή στο τάγγισμα. Οι τιμές της βιβλιογραφίας παρουσιάζουν εξαιρετικά

μεγάλο εύρος τόσο για τα FFA (0,01-0,7%), όσο και για το PV (0,05-3,5 meq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>) (Al-Bachir, 2004; Bakkalbaşı et al., 2012; Crowe and White, 2003; Gan et al., 2005; Jensen et al., 2003; Jensen et al., 2001; Johnson et al., 1998; Koyuncu et al., 2003; López et al., 1995; Martínez et al., 2010; Martínez and Maestri, 2008; Mate et al., 1996; Mexis et al., 2009; Mitcham et al., 2004; Özcan et al., 2010; Savage et al., 2001; Vanhanen and Savage, 2006; Wang et al., 2001; Wang et al., 2006; Wang et al., 2007; Wilson-Kakashita et al., 1995). Οι μεγάλες αυτές διακυμάνσεις οφείλονται στο γεγονός ότι οι περισσότερες από τις παραπάνω έρευνες αναφέρονται σε καρυδέλαιο αγνώστων ποικιλιών, που μεταχειρίστηκαν υπό διαφορετικές ή/και άγνωστες συνθήκες (αποφλοιώση, αποξήρανση, χρόνος δειγματοληψίας, μέθοδος εξαγωγής καρυδέλαιου).

## **2.1.5. Αγρονομικά χαρακτηριστικά εξεταζόμενων ποικιλιών**

### **2.1.5.1. Chandler**

Η ποικιλία Chandler δημιουργήθηκε το 1979 στο πανεπιστήμιο Davis της Καλιφόρνια, προήλθε από διασταύρωση μεταξύ των γονότυπων 'Pedro' και 'UC56-224' (Hendricks et al., 1998; Ρούσκας, 2006) και θεωρείται η πιο αξιόλογη ποικιλία καρυδιάς που καλλιεργείται στην Καλιφόρνια (Warmund et al., 2009). Το δέντρο είναι μέσης ζωηρότητας με ημιπλαγιόκλαδη ανάπτυξη κόμης και υψηλό βαθμό πλαγιοκαρπίας (90%). Η ταχύτητα εισόδου σε καρποφορία είναι εξαιρετικά γρήγορη και σε πλήρη καρποφορία μπαίνει κατά το 10 έτος. Η 'Chandler' είναι ποικιλία πολύ παραγωγική και ο καρπός ωριμάζει τέλη Σεπτεμβρίου με αρχές Οκτωβρίου. Το ενδοκάρπιο έχει σχήμα επίμηκες-κοντό, πολύ ελκυστική εμφάνιση, σχετικά αδύνατη συγκόλληση βαλβίδων κελύφους και το σπέρμα αποχωρίζεται εύκολα από το κέλυφος. Το βάρος ολόκληρου του καρυδιού κυμαίνεται από 11,5-13 g με ποσοστό σπέρματος 48-52%.

### **2.1.5.2. Franquette**

Η ποικιλία Franquette κατάγεται από την περιοχή Isere στη Γαλλία από όπου προήλθε σαν επιλογή (Hendricks et al., 1998; Ποντίκης, 2000; Ρούσκας, 2006), και αποτελεί μια από τις σημαντικότερες ποικιλίες που καλλιεργούνται παγκοσμίως. Το δέντρο έχει ζωηρή βλάστηση με ημιορθόκλαδη-ορθόκλαδη ανάπτυξη κόμης χαρακτηρίζεται ως ακρόκαρπη. Η ταχύτητα εισόδου σε καρποφορία είναι μέση και εισέρχεται σε πλήρη καρποφορία κατά το 14 έτος. Η 'Franquette' είναι ποικιλία αρκετά παραγωγική και ο καρπός ωριμάζει μέσα με τέλη Οκτωβρίου. Το ενδοκάρπιο έχει σχήμα επίμηκες ελλειπτικό, καλή εμφάνιση, ισχυρή συγκόλληση βαλβίδων κελύφους και το σπέρμα αποχωρίζεται εύκολα από το κέλυφος. Το βάρος ολόκληρου του καρυδιού κυμαίνεται από 11-12 g με ποσοστό σπέρματος 43-46%.

### **2.1.5.3. Hartley**

Η ποικιλία Hartley προήλθε σαν επιλογή, από σποροφυτικό πληθυσμό καρυδιάς το 1915 στην Καλιφόρνια (Hendricks et al., 1998; Ποντίκης, 2000; Ρούσκας, 2006), και αποτελεί μια από τις σημαντικότερες ποικιλίες. Το δέντρο είναι μεγάλης ζωηρότητας με ημιορθόκλαδη ανάπτυξη κόμης και μικρό ποσοστό πλαγιοκαρπίας (5-10%). Η ταχύτητα εισόδου σε καρποφορία είναι γρήγορη και κατά το 13 έτος εισέρχεται σε πλήρη καρποφορία. Η Hartley είναι ποικιλία πολύ παραγωγική και ο καρπός ωριμάζει τέλη Σεπτεμβρίου με αρχές Οκτωβρίου. Το ενδοκάρπιο έχει σχήμα κολουροκωνικό, πυραμιδοειδές με αιχμηρή άκρη, ελκυστική εμφάνιση, αρκετά ισχυρή συγκόλληση βαλβίδων κελύφους και το σπέρμα αποχωρίζεται εύκολα από το κέλυφος. Το βάρος ολόκληρου του καρυδιού κυμαίνεται από 11,5-13,5 g με ποσοστό σπέρματος 45-49%.

### **2.1.5.4. Ιόλη**

Η ποικιλία Ιόλη δημιουργήθηκε από το πρόγραμμα βελτίωσης καρυδιάς του ΕΘΙΑΓΕ στο Σταθμό Γεωργικής έρευνας Βαρδάτων και προήλθε ως σπορόφυτο της επιλογής 'ΕΑΑ6'. Το δέντρο έχει μικρή ζωηρότητα με πλαγιόκλαδη ανάπτυξη κόμης και χαρακτηρίζεται ως πλαγιόκαρπη. Η 'Ιόλη' είναι ποικιλία πολύ παραγωγική και ο καρπός ωριμάζει μέσα με τέλη Σεπτεμβρίου. Το ενδοκάρπιο έχει σχήμα σφαιρικό, πολύ ελκυστική εμφάνιση και το σπέρμα αποχωρίζεται εύκολα από το κέλυφος. Το βάρος ολόκληρου του καρυδιού κυμαίνεται από 15-17 g με ποσοστό σπέρματος 50-52%.

### **2.1.6. Μετά-συλλεκτική μεταχείριση καρυδιών**

Οι χειρισμοί που ακολουθούν τη συγκομιδή των καρπών τις καρυδιάς (αποφλοιώση, αποξήρανση, συντήρηση) είναι πολύ σημαντικοί για την ποιότητα του προϊόντος που καταλήγει στον καταναλωτή (Kader and Thompson, 2002).

Μετά τη συγκομιδή, η ταχεία απομάκρυνση των περικαρπίων είναι επιβεβλημένη ώστε να αποφευχθεί το ανεπιθύμητο μαύρισμα των σπερμάτων (Kader and Thompson, 2002). Μετά την αποφλοιώση οι καρποί πρέπει να αποξηρανθούν ώστε να μειωθεί η υγρασία τους σε επίπεδα 3-13% με σκοπό την καλύτερη διατήρησή τους. Οι επιλογές των συνθηκών αποξήρανσης (θερμοκρασία, ροή αέρα, διάρκεια) είναι πολύ κρίσιμη για την ποιότητα των σπερμάτων. Για τα καρύδια το βέλτιστο εύρος θερμοκρασιών που έχει προταθεί είναι 32°-43° C, ενώ όσο μεγαλύτερη είναι η ροή του αέρα ξήρανσης τόσο μικρότερος είναι ο χρόνος που απαιτείται για τη μείωση της υγρασίας στα επιθυμητά επίπεδα. Ο μικρός χρόνος αποξήρανσης είναι κρίσιμος τόσο για την ποιότητα του προϊόντος όσο και για την κατανάλωση ενέργειας που απαιτείται (Hassan-Beygi et al., 2009; Kader and Thompson, 2002).

### **2.1.7. Μεταβολές ποιοτικών χαρακτηριστικών κατά τη συντήρηση των καρυδιών**

Τα αποξηραμένα καρύδια (ολόκληρα ενδικάρπια ή σπέρματα) θεωρούνται ανθεκτικά στη μακρά συντήρηση (12 μο η και περισσότερο), ενώ συσκευασμένα σπέρματα είναι ο συνήθης τρόπος διάθεσης των καρυδιών στην αγορά (Kader and Thompson, 2002). Οι έρευνες που έχουν γίνει σχετικά με τη συντήρηση των καρυδιών έχουν εστιάσει κυρίως στα ποιοτικά χαρακτηριστικά σύμφωνα με την αντίληψη του καταναλωτή. Κατά τη συντήρηση των καρυδιών έχει παρατηρηθεί καφέτιασμα και τάγγισμά των σπερμάτων, τα οποία έχουν καταγραφεί μέσω οργανοληπτικών δοκιμών. Όσον αφορά το χρώμα δεν υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία που να έχουν μελετήσει τις μεταβολές του με αντικειμενικές μεθόδους. Αντίθετα, το τάγγισμα έχει μελετηθεί τόσο μέσω οργανοληπτικών δοκιμών, όσο και με την εκτίμηση των επιπέδων των FFA και του PV.

Η υγρασία, η θερμοκρασία, το φως, το O<sub>2</sub> και οι μικροοργανισμοί αποτελούν εξωγενείς παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα των καρυδιών κατά τη συντήρηση (Crowe and White, 2003; Kader and Thompson, 2002; Lopez et al., 1995; Mexis et al., 2009; Wang et al., 2001; Wang et al., 2006; Wang et al., 2007), ενώ έχουν αναφερθεί και ενδογενείς όπως τα ένζυμα, τα μέταλλα, οι φυτοχημικές ενώσεις (φαινολικά, αντιοξειδωτικά), η περιεκτικότητα και η σύσταση του καρυδέλαιου (Salcedo et al., 2010; Zacheo et al., 1998; Zacheo et al., 2000). Με βάση τη σημασία τους, οι εξωγενείς παράγοντες έχουν καταταγεί σε φθίνουσα σειρά θερμοκρασία > O<sub>2</sub> > φώς (Mexis et al., 2009). Η θερμοκρασία και η διαθεσιμότητα του O<sub>2</sub> μπορούν να θεωρηθούν από τους πιο κρίσιμους παράγοντες που επηρεάζουν τη συντήρηση, δεδομένου ότι η αποφυγή της έκθεσης των σπερμάτων στο φως και την υψηλή υγρασία μπορεί να επιτευχτεί με τη συσκευασία.

Όσον αφορά τη θερμοκρασία συντήρησης, υπάρχουν δεδομένα για ένα εύρος θερμοκρασιών από 3° C έως 40° C (Al-Bachir, 2004; Bakkalbaşı et al., 2012; Crowe and White, 2003; Jensen et al., 2003; Jensen et al., 2001; Koyuncu et al., 2003; López et al., 1995; Mate et al., 1996; Mexis et al., 2009; Savage et al., 2001; Wang et al., 2001; Wang et al., 2006; Wang et al., 2007). Παράλληλα, έχει μελετηθεί η συντήρηση των καρυδιών ατμόσφαιρες με περιεκτικότητα του O<sub>2</sub> εντός του εύρους ~0-50%. Ο έλεγχος της ατμόσφαιρας συντήρησης έχει γίνει είτε με τη συσκευασία των σπερμάτων σε διάφορα υλικά συσκευασίας (υπό κενό ή υπό N<sub>2</sub>) (Bakkalbaşı et al., 2012; Jensen et al., 2003; Mate et al., 1996; Mexis et al., 2009), είτε με τη χρήση απορροφητών O<sub>2</sub> (Jensen et al., 2003). Στις παραπάνω έρευνες έχει βρεθεί ότι η χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης ή/και η χαμηλή περιεκτικότητα του O<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα συντήρησης περιορίζουν το καφέτιασμα και την άνοδο των επιπέδων των FFA και PV.

Τόσο το καφέτιασμα όσο και το τάγγισμα είναι αποτέλεσμα μεταβολικών διεργασιών στις οποίες συμμετέχουν ουσιώδη θρεπτικά συστατικά ενός προϊόντος. Το καφέτιασμα



οφείλεται στην οξείδωση των φαινολικών συστατικών η οποία οδηγεί στο σχηματισμό σκουρόχρωμων χρωστικών (Manzocco et al., 2001; Tomás-Barberán and Espín, 2001). Το υδρολυτικό τάγγισμα προκαλείται με την αποδεύσμευση FA μέσω υδροθερμικής (hydrothermal) ή/και ενζυμικής (με δράση της λιπάσης) υδρόλυσης των τριακυλγλυκερολών (Robards et al., 1988; Wang et al., 2001), ενώ το οξειδωτικό τάγγισμα προκαλείται από την οξείδωση των FA οδηγώντας στον σχηματισμό, σε πρώτο στάδιο, υπεροξειδίων (Frankel, 1991; Mexis et al., 2009; Paradiso et al., 2010; Robards et al., 1988; St. Angelo et al., 1996). Ωστόσο για τις άμεσες ποσοτικές αλλαγές που συμβαίνουν στο επίπεδο των φαινολικών των σπερμάτων και του προφίλ των FA του καρυδέλαιου, κατά τη συντήρηση των καρυδιών δεν υπάρχουν στοιχεία στη βιβλιογραφία.

### **2.1.8. Σκοπός κεφαλαίου**

Συνοπτικά ο σκοπός του παρόντος κεφαλαίου ήταν η μελέτη της συντήρησης των αποξηραμένων καρυδιών και οι μεταβολές των ποιοτικών χαρακτηριστικών τους τόσο με βάση την αντίληψη του καταναλωτή (χρώμα, FFA, PV) όσο και με βάση τα δύο σημαντικότερα χαρακτηριστικά της θρεπτικής τους αξίας (αντιοξειδωτικά και FA).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στις περισσότερες μελέτες της συντήρησης των καρυδιών το φυτικό υλικό ήταν άγνωστης ποικιλίας ή/και άγνωστων μετά-συλλεκτικών χειρισμών από τη συγκομιδή έως την έναρξη της συντήρησης. Για τον λόγο αυτό, στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε να εξεταστούν καρποί από τέσσερις ποικιλίες καλλιεργούμενες υπό τις ίδιες αγρονομικές συνθήκες. Επιλέχθηκαν οι ποικιλίες Chandler, Franquette και Hartley καθώς είναι από τις σημαντικότερες που καλλιεργούνται παγκοσμίως και παράλληλα επιλέχθηκε η ποικιλία Ιόλη η οποία αποτελεί έναν νέο υποσχόμενο ελληνικό γονότυπο καρυδιάς που δημιουργήθηκε από το πρόγραμμα βελτίωσης του ΕΘΙΑΓΕ.

Παράλληλα κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθούν οι επιδράσεις της θερμοκρασίας συντήρησης και της συσκευασίας των καρπών κατά τη διάρκεια ενός έτους συντήρησης των σπερμάτων. Επιλέχθηκε η θερμοκρασία του 1<sup>ο</sup> C, καθώς δεν έχει μελετηθεί έως τώρα η συντήρηση των καρυδιών κάτω από τους 3<sup>ο</sup> C, ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκε και η θερμοκρασία 20<sup>ο</sup> C που προσεγγίζει τη μέση ετήσια θερμοκρασία έκθεσης των καρυδιών όταν δεν συντηρούνται σε θαλάμους ψύξης. Όσον αφορά τη συσκευασία των καρπών επιλέχθηκε να γίνει σε ευρέως διαδεδομένο υλικό συσκευασίας (πολυαμίδιο || πολυαιθυλένιο) υπό τρία αέρια (αέρας, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) ώστε να εκτιμηθεί η επίδραση της ατμόσφαιρας συντήρησης.

## **2.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

---

### **2.2.1. Φυτικό υλικό**

Οι καρποί που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη συλλέχθηκαν από ποικιλίες καρυδιάς (Chandler, Franquette, Hartley και Ιόλη) καλλιεργούμενες στον Σταθμό Γεωργικής Έρευνας Βαρδάτων (ΕΘΙΑΓΕ Βαρδάτων) (φ: 38°49'37''B, λ: 22°26'10''A, υψόμετρο 12 m). Από τις 'Chandler', 'Hartley' και 'Ιόλη' συγκομίστηκαν καρποί στις 28 Σεπτεμβρίου, ενώ από την 'Franquette' η συγκομιδή έγινε στις 7 Οκτωβρίου. Για όλες τις ποικιλίες συγκομίστηκαν καρποί από τέσσερα δένδρα, τα οποία είχαν επισημανθεί και η διάταξή τους στο πειραματικό τεμάχιο ήταν τυχαία. Για να ελαχιστοποιηθεί η επίδραση διαφορετικών σταδίων ωριμότητας στα χαρακτηριστικά των καρπών η συγκομιδή έγινε κατά το στάδιο της πλήρους ωριμότητας. Το στάδιο αυτό προσδιορίζεται όταν το περικάρπιο (hull) αποχωρίζεται εύκολα από το ξυλοποιημένο ενδοκάρπιο (κέλυφος, shell) και ο διαφραγματικός ιστός (packing tissue) που διαχωρίζει τα δύο ημισπέρμια (kernel) έχει αποκτήσει ανοικτό καφέ χρωματισμό (Kader and Thompson, 2002; Ποντίκης, 2000). Οι καλλιεργητικές φροντίδες ήταν οι ίδιες για όλα τα δένδρα και πραγματοποιήθηκαν από το προσωπικό του ΕΘΙΑΓΕ Βαρδάτων.

### **2.2.2. Αποφλοιώση-αποξήρανση-διαλογή καρπών**

Η απομάκρυνση των περικάρπιων έγινε με ηλεκτροκίνητο αποφλοιωτικό μηχάνημα αμέσως μετά τη συγκομιδή, ώστε να αποφευχθεί το ανεπιθύμητο μαύρισμα των κελυφών (Kader and Thompson, 2002). Η αποξήρανση των καρπών έγινε σε εμπορικό ξηραντήρα με συνεχή ροή αέρα  $1500 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$  για 24 h στους  $36^\circ \text{ C}$ , ώστε η υγρασία τους να ελαττωθεί σε επίπεδο 3-13% (w/w). Μετά την αποξήρανση οι καρποί μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο, εντός λίγων ωρών. Στο εργαστήριο, αρχικά έγινε διαλογή για την απομάκρυνση των καρπών που δεν εμφάνιζαν τυπικά χαρακτηριστικά και στη συνέχεια έγινε απομάκρυνση του κελύφους στους καρπούς που επρόκειτο να συσκευαστούν.

### **2.2.3. Πειραματικό σχέδιο και χαρακτηριστικά των καρπών που αξιολογήθηκαν**

Το πειραματικό μέρος περιλάμβανε συντήρηση των καρυδιών για ένα έτος, σε δύο πειραματικά μέρη (Πειράματα Α και Β). Μελετήθηκαν χαρακτηριστικά του εδώδιμου μέρους (σπέρμα) και του καρυδέλαιου. Συγκεκριμένα στο Πείραμα Α, εξετάστηκαν το ποσοστό υγρασίας, η ελαιοπεριεκτικότητα, το χρώμα, τα TP και η TAC. Στο Πείραμα Β μελετήθηκαν χαρακτηριστικά της λιπαρής φάσης των καρπών και συγκεκριμένα τα FFA, ο PV και το προφίλ των FA του καρυδέλαιου.

Τα πειράματα σχεδιάστηκαν ως παραγοντικά κατά το εντελώς τυχαιοποιημένο σχέδιο (Καλτσίκης, 1989). Εξετάσθηκε η επίδραση τεσσάρων παραγόντων στα χαρακτηριστικά των καρυδιών κατά τη συντήρησή τους. Συγκεκριμένα εξετάσθηκαν οι παράγοντες ποικιλία (τέσσερα επίπεδα: 'Chandler', 'Franquette', 'Hartley', 'Ιόλη'), χρόνος συντήρησης (τέσσερα ή δύο επίπεδα: 0, 4, 8, 12 mo ή 0, 12 mo, αντίστοιχα), θερμοκρασία συντήρησης (δύο επίπεδα: 1° C, 20° C) και τρόπος συντήρησης (τρία επίπεδα: συσκευασία σπερμάτων σε αέρα, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>). Το πρώτο επίπεδο του παράγοντα χρόνος συντήρησης (0 mo) αντιστοιχεί στα χαρακτηριστικά των καρυδιών κατά τη συγκομιδή. Για κάθε συνδυασμό των τεσσάρων παραγόντων και των επιπέδων τους χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις επαναλήψεις ( $n = 4$ ).

#### **2.2.4. Συσκευασία-Συντήρηση καρπών**

Για τη συσκευασία των καρπών χρησιμοποιήθηκε υλικό συσκευασίας (Rovac A, CASFIL, Portugal) με χαρακτηριστικά: πάχος μεμβράνης 80 μm (60 μm πολυαιθυλένιο, 20 μm πολυαμίδιο), πυκνότητα 76,28 g m<sup>-2</sup> και διαπερατότητα στο οξυγόνο 46 ml m<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup> bar<sup>-1</sup>. Περίπου 100 g ημισπερμίων (~20 ημισπέρμια) τοποθετήθηκαν στη συσκευασία, ακολούθησε η έγχυση του αερίου συσκευασίας και σφράγισμα σε τελικό όγκο συσκευασίας 300 ml. Χρησιμοποιήθηκε η μηχανή συσκευασίας Henkovac 1900 (Howden Food Equipment, The Netherlands) με το ακόλουθο πρόγραμμα: εφαρμογή κενού για 5 s, έκχυση αερίου υπό πίεση 3 bar για 5 s και θερμοκόλληση για 2 s. Τα αέρια συσκευασίας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αέρας (air), άζωτο (N<sub>2</sub>) και διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>). Κάθε συσκευασία αποτελούσε μια επανάληψη.

Στη συνέχεια οι μισές συσκευασίες (επανάληψεις) τοποθετήθηκαν σε θάλαμο συντήρησης με συνθήκες 1° C και 50% R.H. και οι υπόλοιπες σε θάλαμο συντήρησης με συνθήκες 20° C και 50% R.H., όπου παρέμειναν για χρονικό διάστημα έως και 12 mo. Έτσι, με βάση την θερμοκρασία και τον τρόπο συντήρησης, προέκυψαν για κάθε ποικιλία έξι συνδυασμοί συνθηκών συντήρησης οι οποίοι κωδικοποιήθηκαν ως: 1-air, 1-N<sub>2</sub>, 1-CO<sub>2</sub>, 20-air, 20-N<sub>2</sub>, 20-CO<sub>2</sub>. Για κάθε δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε, μετά από 4, 8, 12 mo, στις συσκευασίες γινόταν τοποθέτηση διαφράγματος σιλικόνης ώστε να ληφθεί δείγμα για να προσδιοριστεί το O<sub>2</sub> εντός της συσκευασίας.

Η μέτρηση της περιεκτικότητας της ατμόσφαιρας συντήρησης σε O<sub>2</sub> έγινε με τη μέθοδο της αερίου-χρωματογραφίας σύμφωνα με τη μέθοδο των Tsantili et al. (2002). Χρησιμοποιήθηκε ο αέριος χρωματογράφος HP 5390 Series II (Hewlett Packard, USA) εξοπλισμένος με ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας (Thermal conductivity detector, TCD) και στήλη μοριακού κόσκινου (Molecular sieve column, MSC) διαστάσεων 300 cm μήκος × 0,2 cm i.d., 40-60 mesh. Συγκεκριμένα με τη χρήση υάλινης αεροστεγούς σύριγγας γινόταν λήψη 1 ml δείγματος από την υπερκείμενη των καρπών ατμόσφαιρα και έγχυση της στον

χρωματογράφο. Το φέρον αέριο ήταν ήλιο (He) με ροή 50 ml min<sup>-1</sup>, ενώ η θερμοκρασία εισαγωγέα και ανιχνευτή ήταν 150° C και 200° C, αντίστοιχα. Το θερμικό πρόγραμμα του κλιβάνου παρέμεινε ισόθερμο στους 60° C. Το ποσοστό του O<sub>2</sub> στο δείγμα υπολογίστηκε με βάση πρότυπο αέριο μείγμα περιεκτικότητας 2% σε O<sub>2</sub> (v/v).

## **2.2.5. Μετρήσεις ποιοτικών-καρπολογικών χαρακτηριστικών**

### **2.2.5.1. Υγρασία και ελαιοπεριεκτικότητα σπέρματος**

Για τον υπολογισμό της υγρασίας και της ελαιοπεριεκτικότητας για κάθε δείγμα 20 ημισπέρμια τεμαχίστηκαν σε εργαστηριακό ομογενοποιητή (Model 38BL40, Waring commercial, New Hartford, USA) για 5 s. Ζυγίστηκαν 10 g και αποξηράνθηκαν σε φούρνο στους 60° C για 7 d. Έπειτα το δείγμα τοποθετήθηκε σε πυραντήριο στους 105° C για 3 h και με ζύγιση υπολογίστηκε η περιεκτικότητα του καρπού σε νερό η οποία εκφράστηκε ως εκατοστιαία περιεκτικότητα (% w/w).

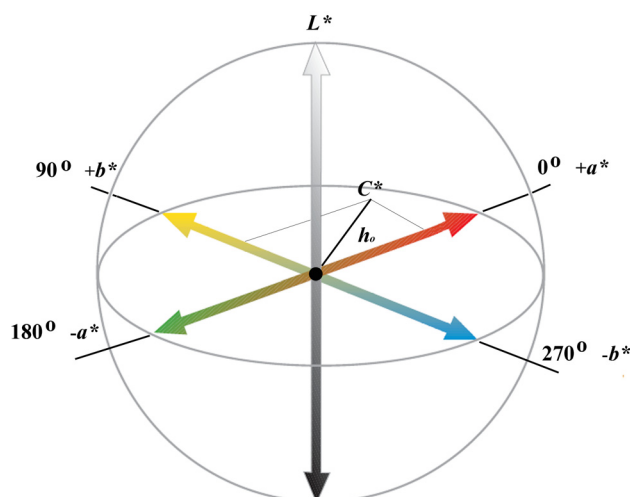
Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των καρπών σε λάδι έγινε με εκχύλιση σε συσκευή Soxhlet. Πέντε (5) g ξηρού δείγματος μεταφέρθηκαν σε ειδικό χάρτινο φυσίγγιο εκχύλισης (καρτούσα). Το φυσίγγιο τοποθετήθηκε στον εκχειλιστήρα στον οποίο είχε προσαρμοστεί προζυγισμένη φιάλη με 50 ml πετρελαιοειδούς αιθέρα (b.p. 40-60 °C). Το δείγμα εκχειλίστηκε για 6 h με ρυθμό ενός σιφονισμού ανά 3 min. Μετά την εκχύλιση ο διαλύτης απομακρύνθηκε σε περιστρεφόμενο συμπυκνωτή σε θερμοκρασία 50° C και κατόπιν η φιάλη τοποθετήθηκε σε πυραντήριο στους 105° C για 10 min. Μετά την πλήρη απομάκρυνση του διαλύτη η φιάλη τοποθετήθηκε σε ξηραντήρα για να ψυχθεί και η ποσότητα του καρυδέλαιου υπολογίστηκε με ζύγιση από την οποία προέκυψε η εκατοστιαία περιεκτικότητα των καρπών σε καρυδέλαιο (% w/w).

### **2.2.5.2. Χρώμα σπέρματος**

Για τη μέτρηση του χρώματος του σπέρματος των καρυδιών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της χρωματομετρίας και συγκεκριμένα το διαφορικό χρωματόμετρο Minolta CR-300 (Minolta, Germany) όπου μετράει τις CIE (Commission internationale de l'éclairage) συντεταγμένες  $L^*$ ,  $a^*$  και  $b^*$ . Η έκφραση του χρώματος έγινε σύμφωνα με τον McGuire (1992) και χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές της συντεταγμένης  $L^*$ , όπως προέκυψαν από το χρωματόμετρο και οι παράμετροι Hue angle ( $h^o$ ) και Chroma ( $C^*$ ), οι οποίες υπολογίστηκαν από τις τιμές των συντεταγμένων  $a^*$  και  $b^*$  ως:  $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$  και  $h^o = \tan^{-1} (b^* a^{*-1})$ . Παράλληλα υπολογίστηκε και η παράμετρος Whiteness Index (WI) σύμφωνα με τους Boun and Huxsoll (1991) ως:  $WI = 100 - [(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$ .

Το  $L^*$  αποδίδει τη φωτεινότητα, ενώ οι παράμετροι  $h^o$  και  $C^*$  εκφράζουν το χρώμα που κυριαρχεί και την έντασή του, αντίστοιχα. Στο παρακάτω χρωματογραφικό διάγραμμα

απεικονίζονται οι μεταβολές του χρώματος σε σχέση με τις παραμέτρους  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $h^o$  και  $C^*$  (Σχήμα 2.1).



**Σχήμα 2. 1.** Χρωματογραφικό διάγραμμα των παραμέτρων του  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $h^o$  και  $C^*$ .

Για τη μέτρηση του χρώματος του σπέρματος λήφθηκε μέτρηση στο πάνω δεξιά μέρος του κάθε ημισπερμίου (Εικόνα 2.1). Τα συγκεκριμένα σημεία λήψης της μέτρησης επιλέχθηκαν, καθώς αποτελούν τα τμήματα όπου η επιφάνεια τους είναι ομαλή και γίνεται καλή εφαρμογή του φωτοκύτταρου του οργάνου.



**Εικόνα 2. 1.** Σημείο σπέρματος στο οποίο γινόταν η λήψη της μέτρησης του χρώματος

Η μέτρηση του χρώματος πραγματοποιήθηκε σε σκοτεινό θάλαμο και τέσσερις δειγματοληψίες μετά από 0, 4, 8 και 12 μο συντήρησης.

## **2.2.6. Εκτίμηση αντιοξειδωτικών ουσιών καρπών**

### **2.2.6.1. Εκχύλιση αντιοξειδωτικών ουσιών**

Η εκχύλιση των αντιοξειδωτικών ουσιών από τα σπέρματα πραγματοποιήθηκε με συνδυασμό των μεθόδων που έχουν χρησιμοποιηθεί στα καρύδια και άλλους καρπούς (Anderson et al., 2001; Halvorsen et al., 2002; Kornsteiner et al., 2006; Shin et al., 2007), με ορισμένες τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, 20 ημισπέρμια τεμαχίστηκαν σε εργαστηριακό μπλέντερ (Model 38BL40, Waring commercial, New Hartford, USA) για 5 s και κατόπιν ομογενοποιήθηκαν με διάλυμα ( $5 \text{ ml g}^{-1}$  ιστού) 80% ακετόνης (v/v) σε διπλά απεσταγμένο νερό (DDW) σε συσκευή Ultra-Turrax (T 25, Kika Labortechnik, Germany) για 2 min (1 min στις 9500 rpm και 1 min στις 13500 rpm). Στη συνέχεια το ομογενοποιημένο δείγμα μεταφέρθηκε σε σφραγιζόμενο φιαλίδιο, η υπερκείμενη ατμόσφαιρα πληρώθηκε με  $\text{N}_2$  και η

εκχύλιση συνεχίστηκε σε λουτρό υπερήχων για 30 min και επώαση για 2 h. Ακολούθησε διήθηση σε χωνί τύπου büchner (90 mm i.d.) με διηθητικό χαρτί Whatman # 1 (MN 615, Marcherey-Nagel, Germany) και έγιναν δύο επιπλέον εκπλήσσεις με 5 ml διαλύματος εκχύλισης. Όλα τα στάδια της παραπάνω διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 4° C. Το διήθημα τοποθετήθηκε σε εξατμιστήρα και η ακετόνη απομακρύνθηκε υπό N<sub>2</sub> στους 37° C. Μετά την απομάκρυνση της ακετόνης το δείγμα επαναδιαλύθηκε σε 50% μεθανόλη (MeOH) και αποθηκεύθηκε στους -80° C.

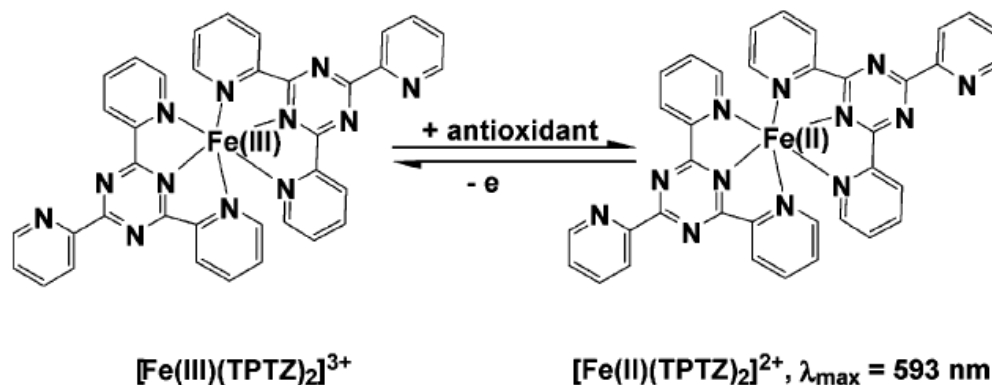
#### **2.2.6.2. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών (TP)**

Τα ολικά φαινολικά (TP) προσδιορίστηκαν με κάποιες τροποποιήσεις της μεθόδου Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999), σύμφωνα με τους Tsantili et al. (2010). Σε δοκιμαστικό σωλήνα με 2,6 ml DDW προστέθηκαν 0,2 ml αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και 0,2 ml εκχυλίσματος, αραιωμένο στην κατάλληλη συγκέντρωση. Το μείγμα παρέμεινε για 6 min σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν προστέθηκαν 2 ml ανθρακικού νατρίου (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 7% (w/v). Το μείγμα επώαστηκε για 90 min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι και μετρήθηκε η απορρόφηση του σε μήκος κύματος 750 nm. Τα μετρούμενα ολικά φαινολικά προσδιορίστηκαν με βάση πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέως (GA) και εκφράστηκαν ως ισοδύναμα mg GA ανά g ξηρού βάρους (DW) σπέρματος (mg GAE g<sup>-1</sup> DW σπέρματος). Τα TP προσδιορίστηκαν σε τέσσερις δειγματοληψίες 0, 4, 8 και 12 mo εις διπλούν για κάθε επανάληψη.

#### **2.2.6.3. Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)**

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) εκτιμήθηκε με δύο μεθόδους, την FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) και την DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity). Η επιλογή δύο διαφορετικών μεθόδων προτείνεται για την καλύτερη αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, καθώς μόνο μία μέθοδος δεν αρκεί να δώσει μια ολοκληρωμένη εικόνα αυτής (Prior and Cao, 1999; Prior et al., 2005).

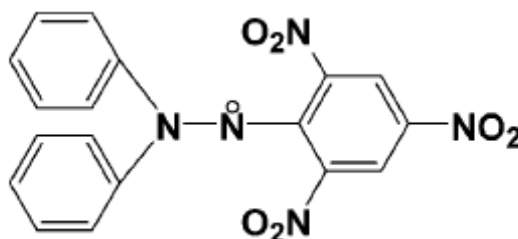
Η μέθοδος FRAP εφαρμόστηκε σύμφωνα με τους (Benzie and Strain, 1996) και στηρίζεται στη μείωση του θετικού φορτίου του τρισθενούς σιδήρου στο σύμπλοκο Fe<sup>3+</sup>-TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) κατά την παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού σε όξινο μέσο και στο σχηματισμό του συμπλόκου Fe<sup>2+</sup>-TPTZ, το οποίο έχει κυανό χρώμα (Σχήμα 2.2).



**Σχήμα 2. 2.** Αναγωγή του συμπλόκου  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ σε  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ παρουσία αντιοξειδωτικού (κατά Huang et al., 2005).

Για την εκτέλεση της μεθόδου παρασκευάστηκε το αντιδραστήριο FRAP από τρία διαλύματα, δηλαδή το ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ) 300 mM με pH 3,6, το διάλυμα TPTZ 10 mM διαλυμένο σε 40 mM υδροχλωρικού οξέως (HCl) και το διάλυμα 20 mM  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Το αντιδραστήριο προκύπτει μετά την ανάμειξη των παραπάνω διαλυμάτων σε αναλογία 10:1:1, με τη σειρά που αναφέρθηκαν παραπάνω. Στη συνέχεια σε σφραγιζόμενο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 3 ml αντιδραστηρίου FRAP (προθερμασμένο στους  $37^\circ \text{C}$ ), προστέθηκαν 0,1 ml εκχυλίσματος και το μείγμα επώαστηκε στους  $37^\circ \text{C}$  για 30 min σκοτάδι. Κατόπιν μετρήθηκε η απορρόφηση σε μήκος κύματος 593 nm.

Η μέθοδος DPPH εφαρμόστηκε σύμφωνα με τους (Brand-Williams et al., 1995) και βασίζεται στη μείωση της απορρόφησης της ρίζας DPPH $\cdot$  (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) όταν έρθει σε επαφή με αντιοξειδωτικές ουσίες. Η ρίζα DPPH $\cdot$  (Σχήμα 2.3), σημειώνει το μέγιστο της απορρόφησης της σε μήκος κύματος 515 nm.



**Σχήμα 2. 3.** Η ρίζα DPPH (2,2- διφαινύλ-1-πυκριδραζύλ) (κατά Huang et al., 2005).

Για την εκτέλεση της μεθόδου σε σφραγιζόμενο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 3,9 ml μεθανολικού διαλύματος DPPH συγκέντρωσης 60 mM προστέθηκε 0,1 ml εκχυλίσματος. Έπειτα από 30 min επώαση σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι, μετρήθηκε η μείωση της απορρόφησης στα 515 nm.

Στην εκτίμηση της TAC, και για τις δύο μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν, η διάρκεια της επώασης (30 min) που επιλέχθηκε αντιστοιχούσε στο χρόνο που απαιτήθηκε ώστε να

σταθεροποιηθεί η αντίδραση. Η TAC προσδιορίστηκε με βάση πρότυπη καμπύλη trolox acid (TA, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) και εκφράστηκε ως ισοδύναμα  $\mu\text{mol TA}$  ανά  $\text{g}$  ξηρού βάρους (DW) σπέρματος ( $\mu\text{mol TAE g}^{-1}$  DW σπέρματος). Η TAC προσδιορίστηκε σε τέσσερις δειγματοληψίες 0, 4, 8 και 12 mo εις διπλούν για κάθε επανάληψη.

### **2.2.7. Εκτίμηση χαρακτηριστικών του καρυδέλαιου των καρπών**

#### **2.2.7.1. Εξαγωγή καρυδέλαιου**

Η λήψη του καρυδέλαιου από τους καρπούς, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για τις αναλύσεις των ποιοτικών και οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών, έγινε με ψυχρή έκθλιψη σε όργανο που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο Δενδροκομίας (Παράρτημα II). Το όργανο περιελάμβανε περιστρεφόμενο κοχλία με τον οποίο μπορούσε να ασκηθεί συγκεκριμένης έντασης ροπή στρέψης (μετρούμενη σε  $\text{N m}$ ) σε δύο συγκλίνουσες περιοριστικές πλάκες ( $10 \times 5 \text{ cm}$ ). Οι συγκλίνουσες πλάκες ήταν αφαιρούμενες ώστε να μπορούν να ψύχονται στην επιθυμητή θερμοκρασία έκθλιψης. 50 g ψυχρών σπερμάτων (στους  $4^\circ \text{C}$ ) τοποθετήθηκαν μεταξύ των πλακών και ασκήθηκε ροπή στρέψης 30  $\text{N m}$  για 10 s. Το καρυδέλαιο συλλέχτηκε σε σωλήνα φυγοκέντρου και ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 5000 g για 1 min ώστε να απομακρυνθεί το νερό. Το υπερκείμενο καρυδέλαιο συλλέχτηκε και χρησιμοποιήθηκε για τις αναλύσεις.

#### **2.2.7.2. Προσδιορισμός ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA)**

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας του καρυδέλαιου σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA, Free fatty acids) έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο 940.28-AOAC (1995). Σε ποτήρι ζέσεως που περιείχε 15 ml φαινολοφθαλείνης (0,25% v/v) σε MeOH προστέθηκαν 2,15 g καρυδέλαιου και ακολούθησε έντονη ανάδευση για 1 min. Κατόπιν ακολούθησε τιτλοδότηση με 5 mN καυστικού νατρίου (NaOH) μέχρις ότου το διάλυμα αποκτήσει ελαφρά ερυθρό χρώμα. Με βάση την κατανάλωση του NaOH που απαιτήθηκε για την εξουδετέρωση του διαλύματος υπολογίστηκε η ποσότητα των FFA του καρυδέλαιου και εκφράστηκε ως μάζα % ελαϊκού οξέως (OL) ανά μονάδα μάζας καρυδέλαιου, % (w/w) στο καρυδέλαιο. Η μέτρηση των FFA πραγματοποιήθηκε σε δύο δειγματοληψίες μετά από 0 και 12 mo συντήρησης.

#### **2.2.7.3. Προσδιορισμός βαθμού υπεροξειδίων (PV)**

Ο προσδιορισμός του βαθμού υπεροξειδίων (PV, Peroxide value) του καρυδέλαιου έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο 965.33-AOAC (1995). Συγκεκριμένα, 1 g καρυδέλαιου προστέθηκε σε ποτήρι ζέσεως που περιείχε 6 ml διαλύματος οξικό οξύ ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ) σε χλωροφόρμιο ( $\text{CHCl}_3$ ) σε αναλογία 3:2 (v/v). Κατόπιν προστέθηκαν 0,1 ml κορεσμένου



ιωδιούχου καλίου (KI) και 6 ml DDW. Ακολούθησε τιτλοδότηση με διάλυμα θειοθειικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 0,1 N μέχρις ότου αποχρωματιστεί το υποκίτρινο χρώμα του διαλύματος, προστέθηκε 0,1 ml διαλύματος αμύλου (1% w/v) και συνεχίστηκε η τιτλοδότηση μέχρι να εξαφανιστεί ο μπλε χρωματισμός. Όλη η διαδικασία έγινε σε απαγωγό εστία. Με βάση την κατανάλωση του  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  υπολογίστηκε ο PV του καρυδέλαιου και εκφράστηκε ως χιλιοστά ισοδυνάμων υπεροξειδίων ανά kg καρυδέλαιου, μεq υπεροξειδίων  $\text{kg}^{-1}$  καρυδέλαιου (meq  $\text{O}_2 \text{ kg}^{-1}$ ).

#### **2.2.7.4. Προσδιορισμός του προφίλ των λιπαρών οξέων**

Η ανάλυση της σύστασης του καρυδέλαιου σε λιπαρά οξέα (FA) έγινε με τη μέθοδο της ανάλυσης των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (FAME) με αέριο-χρωματογραφία. Η μέθοδος παρασκευής των FAME καθώς και η χρωματογραφική τους ανάλυση έγινε με συνδυασμό των μεθόδων 969.33-AOAC (1995), Park and Goins (1994), με ορισμένες τροποποιήσεις. Η παρασκευή των FAME έγινε σε πυρίμαχα φιαλίδια ( $12 \times 100$  mm) με καπάκι εσωτερικής επιφάνειας Teflon. 100 ml καρυδέλαιου τοποθετήθηκαν στο φιαλίδιο και ζυγίστηκαν ώστε να είναι δυνατή η αναγωγή των FA σε μονάδες μάζας. Έπειτα, ακολούθησε υδρόλυση των τρι-γλυκεριδίων με προσθήκη 1 ml μεθανολικού διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) 0,5 N και επώαση στους  $50^\circ \text{C}$  σε υδατόλουτρο για 2 h. Πριν την τοποθέτηση του φιαλιδίου στο υδατόλουτρο έγινε πλήρωση της υπερκείμενης ατμόσφαιρας με  $\text{N}_2$  και σφράγισμά με το καπάκι. Στη συνέχεια το φιαλίδιο ψήχθηκε ελαφρά και ακολούθησε εστεροποίηση των FA με προσθήκη 1 ml μεθανολικού διαλύματος τριφθοριούχου βρωμίου ( $\text{BF}_3$ ) 14% (w/v) και επώαση στους  $50^\circ \text{C}$  για 2 h. Η επώαση και στο στάδιο της εστεροποίησης έγινε σε υδατόλουτρο αφού προηγήθηκε πλήρωση της υπερκείμενης ατμόσφαιρας του φιαλιδίου με  $\text{N}_2$ . Κατά διάρκεια της επώασης του δείγματος, τόσο κατά την υδρόλυση όσο και κατά την εστεροποίηση, ανά 20 min γινόταν ανάδευση σε συσκευή Vortex για 2 s. Για τη λήψη των FAME μετά το στάδιο της εστεροποίησης, το φιαλίδιο ψήχθηκε ήπια σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκαν 1 ml DDW και 0,5 ml εξανίου ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ), και ακολούθησε έντονη ανάδευση για 1 min. Στη συνέχεια το φιαλίδιο φυγοκεντρήθηκε στα 2500 g για 2 min και η υπερκείμενη φάση εξανίου μεταφέρθηκε σε ειδικό αεροστεγές φιαλίδιο όγκου 0,5 ml για να αναλυθεί στον αέριο-χρωματογράφο. Η παραπάνω διαδικασία έγινε σε απαγωγό εστία.

Η ανάλυση έγινε με έγχυση 1 μl δείγματος σε αέριο χρωματογράφο HP 5890 Series II (Hewlett Packard, USA) εξοπλισμένο με εισαγωγέα split/splitless, ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID, Flame Ionization Detector) και τριχοειδή στήλη (DB-23, J & W Scientific, UK) διαστάσεων 60 m μήκος  $\times$  0,25 mm i.d., 0,25 μm πάχος μεμβράνης. Χρησιμοποιήθηκε ήλιο (He) ως φέρον αέριο με γραμμική ταχύτητα  $33 \text{ cm s}^{-1}$  και αναλογία split 50:1. Η θερμοκρασία

του εισαγωγέα και του ανιχνευτή ήταν 250° C και 260° C, αντίστοιχα. Για το διαχωρισμό των FAME χρησιμοποιήθηκε στον κλίβανο του χρωματογράφου το ακόλουθο θερμικό πρόγραμμα: ισόθερμο στους 185° C για 10 min, αύξηση στους 215° C με ρυθμό 10° C min<sup>-1</sup>, ισόθερμο στους 215° C for 10 min, αύξηση στους 230° C με ρυθμό 15° C min<sup>-1</sup> και ισόθερμο στους 230° C για 4 min. Στον ανιχνευτή η ροή του υδρογόνου (H<sub>2</sub>), του αέρα και του ηλίου (He) ήταν 40, 450 και 30 ml min<sup>-1</sup>. Πρότυπα μείγματα FAME (GLC-20, Supelco, UK; Me93, Larodan Fine Chemicals, Sweden) χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση και τα αποτελέσματα για κάθε FA εκφράστηκαν ως % (w/w) στο καρυδέλαιο.

### **2.2.8. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων**

Η επίδραση των τεσσάρων παραγόντων επί των χαρακτηριστικών που εξετάστηκαν εκτιμήθηκε με δι- και τρι-παραγοντικές αναλύσεις της διασποράς (ANOVA) σε συνδυασμούς των τριών από τους τέσσερις παράγοντες. Συγκεκριμένα, έγιναν τρι-παραγοντικές ANOVA ανά χρόνο συντήρησης (ποικιλία × θερμοκρασία × συσκευασία) συμπεριλαμβάνοντας δείγματα από τις δειγματοληψίες 4, 8 και 12 mo. Για κάθε έναν από τους συνδυασμούς θερμοκρασίας και συσκευασίας έγινε δι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία × χρόνος) με σκοπό να εκτιμηθούν οι μεταβολές των χαρακτηριστικών από την έναρξη (0 mo) έως και το πέρας της συντήρησης (12 mo). Τέλος για την εκτίμηση των διαφορών μεταξύ των ποικιλιών κατά τη συγκομιδή έγινε μόνο-παραγοντική ANOVA. Οι συγκρίσεις των μέσων έγιναν με βάση τη μέθοδο της έντιμης σημαντικής διαφοράς (HSD, Honest Significant Difference) της μεθόδου Tukey-HSD.

Οι αναλύσεις συσχέτισης και κυρίων συνιστωσών (PCA, Principal Component Analysis), εφαρμόστηκαν με σκοπό να γίνει γενική εκτίμηση της παραλλακτικότητας, και να διερευνηθούν οι σχέσεις μεταξύ των μεταβλητών. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της PCA έγινε με βάση την eigenvalue και το ποσοστό της διακύμανσης που εξηγείται από κάθε συνιστώσα αλλά και συνολικά. Από το γράφημα της θέσης των τιμών των κυρίων συνιστωσών (score plot) έγινε η ερμηνεία της ομαδοποίησης των δειγμάτων. Από το γράφημα των συντελεστών των κυρίων συνιστωσών (loading plot) έγινε η ερμηνεία των σχέσεων μεταξύ των μεταβλητών. Συγκεκριμένα, εξετάζεται η γωνία που ορίζεται από τη θέση δυο μεταβλητών με βάση το κέντρο του loading plot, αλλά και η θέση τους ως προς της ακραίες τιμές (-1 έως 1) των αξόνων x, y. Ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών υποστηρίζεται όταν η γωνία μεταξύ τους τείνουν στην τιμή 0° και η θέση τους είναι εγγύς στην ακραία τιμή ενός από τους άξονες x, y. Αντίστροφα, ισχυρή αρνητική συσχέτιση υποστηρίζεται όταν η γωνία τείνει στις 180°. Οι σχέσεις μεταξύ των μεταβλητών

εξετάσθηκαν, επίσης, με βάση την πιθανότητα ( $P$ ) και το συντελεστή συσχέτισης ( $r^2$ ) που προέκυψε από την ανάλυση συσχέτισης.

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με το λογισμικό JMP 7.0.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

## 2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 2.3.1. Συγκέντρωση του O<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα της σκευασίας κατά τη συντήρηση

Η αρχική συγκέντρωση του O<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα των συσκευασιών που είχαν πληρωθεί με ξηρό αέρα ήταν 20,72% (v/v), ενώ στις συσκευασίες που είχαν πληρωθεί με N<sub>2</sub> ή CO<sub>2</sub> ήταν μικρότερη του 0,01% (v/v) (Πίνακας 2.6). Κατά τη συντήρηση η σύσταση της ατμόσφαιρας στα 1-air και 20-air παρέμεινε αμετάβλητη, ενώ στις συσκευασίες που είχαν πληρωθεί με N<sub>2</sub> ή CO<sub>2</sub> παρατηρήθηκε μια προοδευτική αύξηση της συγκέντρωσης του O<sub>2</sub>. Η αύξηση αυτή ήταν πιο έντονη στην υψηλή θερμοκρασία συντήρησης φτάνοντας περίπου το 10% O<sub>2</sub> (v/v) μετά από 12 mo στους 20° C. Η πορεία εισόδου του O<sub>2</sub> εντός της συσκευασίας με N<sub>2</sub> ή CO<sub>2</sub> ήταν ανεξάρτητη από το είδος του αερίου πλήρωσης, καθώς σε κάθε δειγματοληψία (4, 8 και 12 mo) και για κάθε θερμοκρασία συντήρησης συγκριτικά (1° C και 20° C) παρατηρήθηκε παρόμοια συγκέντρωση O<sub>2</sub> μεταξύ των συσκευασιών αυτών. Ωστόσο παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση του O<sub>2</sub> εντός της συσκευασίας ήταν περίπου διπλάσια κατά τη συντήρηση στους 20° C σε σχέση με τον 1° C.

**Πίνακας 2. 6.** Συγκέντρωση του O<sub>2</sub>, στις διάφορες δειγματοληψίες, εντός των συσκευασιών που είχαν πληρωθεί με διαφορετικά αέρια.

Θ <sup>†</sup>	Σ <sup>†</sup>	O <sub>2</sub> (% v/v)			
		Μήνες συντήρησης (mo)			
		0	4	8	12
1° C	air	20,72 ± 0,08 <sup>††</sup>	20,75 ± 0,07	20,68 ± 0,06	20,79 ± 0,07
	N <sub>2</sub>	< 0,01 ± 0,00	2,01 ± 0,05	3,90 ± 0,09	5,60 ± 0,28
	CO <sub>2</sub>	< 0,01 ± 0,00	2,07 ± 0,04	3,86 ± 0,11	5,52 ± 0,24
20° C	air	20,78 ± 0,11	20,70 ± 0,05	20,72 ± 0,07	20,75 ± 0,07
	N <sub>2</sub>	< 0,01 ± 0,00	4,38 ± 0,19	7,62 ± 0,17	10,15 ± 0,22
	CO <sub>2</sub>	< 0,01 ± 0,00	4,32 ± 0,17	7,69 ± 0,14	10,21 ± 0,25

<sup>†</sup> Θ: θερμοκρασία, Σ: αέριο συσκευασίας.

<sup>††</sup> Για κάθε δειγματοληψία και για κάθε αέριο οι τιμές αντιστοιχούν στον μέσο τεσσάρων επαναλήψεων (επιλεγμένων τυχαία από σύνολο 16 συσκευασιών) ± τυπική απόκλιση.

### 2.3.2. Περιεκτικότητα υγρασίας και ελαιοπεριεκτικότητα των σπερμάτων

Για όλες τις ποικιλίες και τις δύο πειραματικές περιόδους, η περιεκτικότητα των σπερμάτων σε υγρασία κυμάνθηκε από ~4% έως ~6% (Πίνακας 2.7). Τόσο στο Πείραμα Α όσο και στο Β, η περιεκτικότητα σε υγρασία των σπερμάτων στις τέσσερις ποικιλίες ήταν σε φθίνουσα σειρά ‘Franquette’ > ‘Chandler’ > ‘Hartley’ > ‘Ιόλη’. Το καρυδέλαιο ήταν ποσοτικά το κύριο συστατικό του εδώδιμου μέρους του καρπού και κυμάνθηκε περίπου από 65% έως 72% μεταξύ των τεσσάρων ποικιλιών (Πίνακας 2.7). Στο Πείραμα Α, οι ‘Hartley’ και ‘Franquette’ είχαν υψηλότερη ελαιοπεριεκτικότητα από τις ‘Chandler’ και ‘Ιόλη’, ενώ

στο Πείραμα Β η ‘Hartley’ παρουσίασε σημαντικά υψηλότερες τιμές μόνο από την ‘Chandler’. Η περιεκτικότητα των σπερμάτων τόσο σε υγρασία όσο και σε καρυδέλαιο παρουσίασε μικρές μη σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των δυο πειραματικών μερών ( $P > 0,05$ ).

**Πίνακας 2. 7.** Εκατοστιαία περιεκτικότητα υγρασίας και καρυδέλαιου σε σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς μετά την αποξήρανση, στα Πειράματα Α και Β.

Ποικιλία	Υγρασία (% w/w)		Καρυδέλαιο (% w/w)	
	Πείραμα Α	Πείραμα Β	Πείραμα Α	Πείραμα Β
Chandler	4,91 <sup>b†</sup>	5,05 <sup>b</sup>	65,79 <sup>b</sup>	65,42 <sup>c</sup>
Hartley	4,57 <sup>c</sup>	4,45 <sup>c</sup>	70,32 <sup>a</sup>	69,37 <sup>ab</sup>
Franquette	5,23 <sup>a</sup>	5,73 <sup>a</sup>	71,69 <sup>a</sup>	70,27 <sup>a</sup>
Ιόλη	4,29 <sup>d</sup>	4,08 <sup>d</sup>	66,76 <sup>b</sup>	66,24 <sup>bc</sup>
<i>Pc</i>	***	***	***	**

† Οι μέσοι της κάθε μεταβλητής ακολουθούμενοι από το ίδιο πεζό γράμμα εντός της στήλης, δεν διαφέρουν σημαντικά.

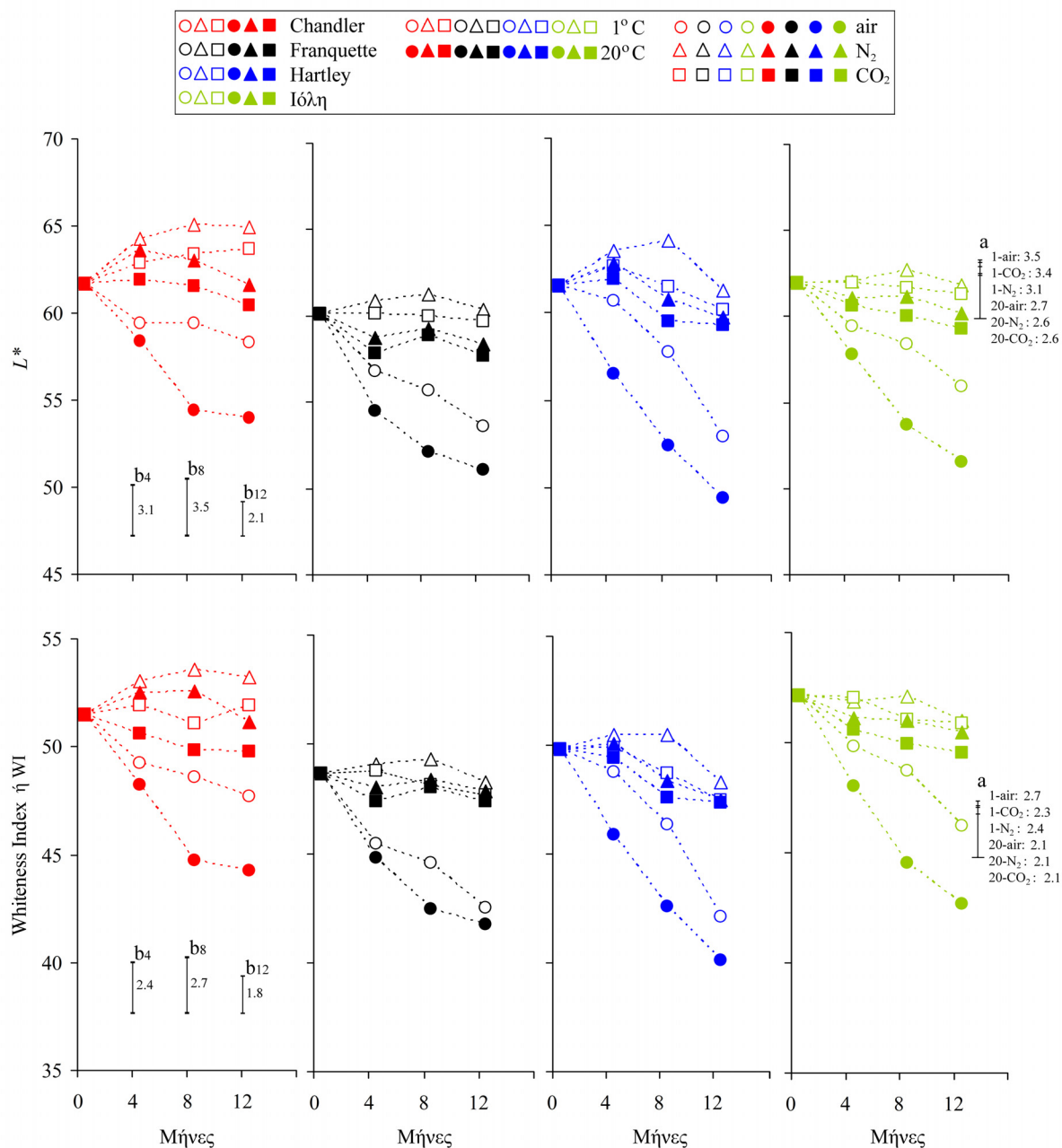
†† Πιθανότητα της επίδρασης της ποικιλίας (*Pc*). \*\* σημαντικό  $P < 0,01$  \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

### 2.3.3. Χρώμα των σπερμάτων μετά την αποξήρανση και κατά τη συντήρηση

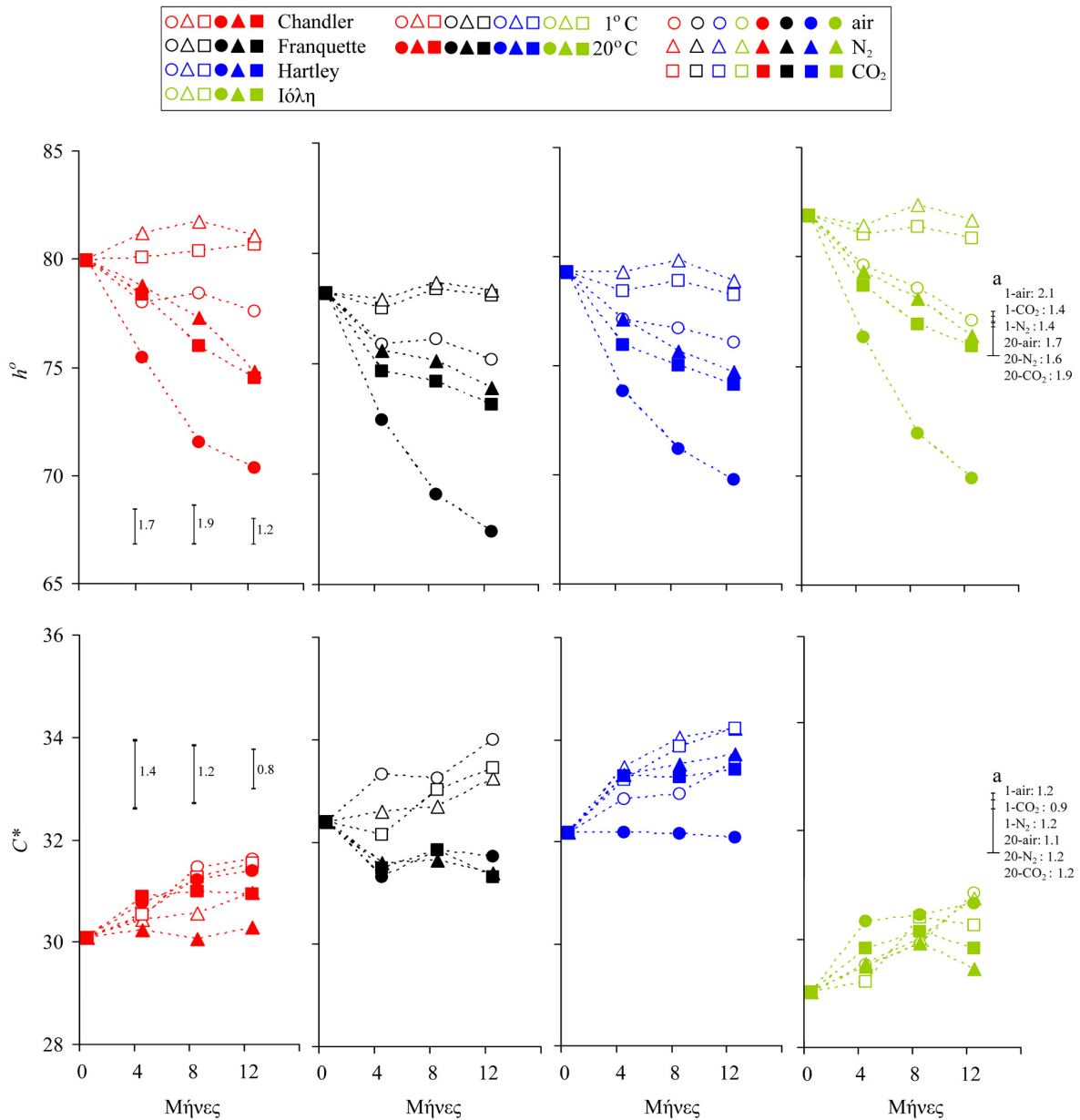
Μετά την αποξήρανση οι τιμές των παραμέτρων του χρώματος των σπερμάτων στις τέσσερις ποικιλίες που εξετάστηκαν, κυμάνθηκαν από 60-62 για το  $L^*$ , 78-82 για το  $h^o$ , 29-32 για το  $C^*$  και 49-52 για το WI (Γραφήματα 2.1 και 2.2). Σημαντικές διαφορές μεταξύ των ποικιλιών παρατηρήθηκαν στις παραμέτρους  $h^o$ ,  $C^*$  και WI, ενώ το  $L^*$  δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την ποικιλία (Πίνακας 2.8). Συγκεκριμένα η ‘Ιόλη’ είχε υψηλότερο  $h^o$  από τη ‘Hartley’ και υψηλότερα  $h^o$  και WI από τη ‘Franquette’, ενώ οι ‘Hartley’ και ‘Franquette’ είχαν υψηλότερο  $C^*$  από τις ‘Chandler’ και ‘Ιόλη’.

Κατά τη συντήρηση παρατηρήθηκε μια γενική τάση μείωσης των παραμέτρων  $L^*$ ,  $h^o$  και WI, ενώ η παράμετρος  $C^*$  παρουσίασε μικρότερες μη σταθερής κατεύθυνσης μεταβολές (Γραφήματα 2.1 και 2.2). Συγκεκριμένα, εξετάζοντας την κύρια επίδραση του χρόνου συντήρησης, οι τιμές  $L^*$ ,  $h^o$  και WI μειώθηκαν σημαντικά σε όλες τις συνθήκες εκτός από τις 1-N<sub>2</sub> και 1-CO<sub>2</sub> (Πίνακας 2.9). Ωστόσο εξετάζοντας τις μεταβολές του  $L^*$  για κάθε ποικιλία, δεν παρατηρήθηκε μείωση στους καρπούς που είχαν συσκευαστεί υπό N<sub>2</sub> και CO<sub>2</sub> και στις δύο θερμοκρασίες συντήρησης. Στις ποικιλίες Hartley, Franquette και Ιόλη, μειωμένες τιμές του  $L^*$  καταγράφηκαν από τους 4 mo στους 20-air και μετά από 12 mo στον 1-air, ενώ στην ‘Chandler’ το  $L^*$  μειώθηκε μόνο στους 20-air από τους 8 mo και έπειτα. Το  $h^o$  μειώθηκε σημαντικά από τους 4 mo στους καρπούς όλων των ποικιλιών που συντηρήθηκαν στους 20° C σε όλα τα είδη ατμόσφαιρας (air, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>), εκτός από τους καρπούς της ‘Chandler’ όπου

στους 20-N<sub>2</sub> και 20-CO<sub>2</sub> μειωμένες τιμές του  $h^o$  εμφανίστηκαν μετά τους 8 mo. Εξετάζοντας την κάθε ποικιλία δεν βρέθηκαν μεταβολές στις τιμές του WI στους καρπούς που συντηρήθηκαν στον 1<sup>ο</sup> C ανεξάρτητα από την αέρια σύσταση της συσκευασίας. Στις ‘Hartley’, ‘Franquette’ και ‘Ιόλη’ το WI μειώθηκε σημαντικά από τους 4 mo στους 20-air και από τους 8 mo στον 1-air, ενώ στην ‘Chandler’ μείωση του WI καταγράφηκε μόνο μετά από τους 8 mo στους 20-air.



**Γράφημα 2. 1.** Παράμετροι  $L^*$  και Whiteness index (WI) του χρώματος στα αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρδιάς συντηρημένα σε συσκευασίες υπό διαφορετικά αέρια (air, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) στον 1<sup>ο</sup> C ή τους 20<sup>ο</sup> C έως 12 mo, στο Πείραμα Α. Οι κάθετες μπάρες αντιστοιχούν στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ . Μπάρα (a), από δι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία × χρόνος συντήρησης) περιλαμβάνοντας όλους τους μήνες συντήρησης για κάθε συνδυασμό συσκευασίας και θερμοκρασίας; Μπάρες (b<sub>4</sub>, b<sub>8</sub>, b<sub>12</sub>), από τρι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία × συσκευασία × θερμοκρασία) περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα σε κάθε δειγματοληψία (4, 8, 12 mo).



**Γράφημα 2. 2.** Παράμετροι  $h^\circ$  και  $C^*$  του χρώματος στα αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρδιάς συντηρημένα σε συσκευασίες υπό διαφορετικά αέρια (air, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) στον 1° C ή τους 20° C έως 12 mo, στο Πείραμα A. Οι κάθετες μπάρες αντιστοιχούν στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ . Μπάρα (a), από δι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  χρόνος συντήρησης) περιλαμβάνοντας όλους τους μήνες συντήρησης για κάθε συνδυασμό συσκευασίας και θερμοκρασίας; Μπάρες ( $b_4$ ,  $b_8$ ,  $b_{12}$ ), από τρι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  συσκευασία  $\times$  θερμοκρασία) περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα σε κάθε δειγματοληψία (4, 8, 12 mo).

Σε όλες τις δειγματοληψίες κατά τη συντήρηση, οι επιδράσεις της θερμοκρασίας και του αερίου συσκευασίας ήταν σημαντικές επί των παραμέτρων  $L^*$ ,  $h^o$  και WI, ενώ το  $C^*$  επηρεάστηκε σημαντικά μόνο από τη θερμοκρασία στους 8 και 12 mo (Πίνακας 2.10). Συγκεκριμένα, τα σπέρματα που συντηρήθηκαν στον 1° C είχαν υψηλότερες τιμές  $L^*$ ,  $h^o$ ,  $C^*$  και WI από τα σπέρματα στους 20° C, με τις διαφορές μεταξύ των θερμοκρασιών να είναι μεγαλύτερες με την πάροδο του χρόνου. Όσον αφορά το αέριο συσκευασίας τα σπέρματα που είχαν συσκευασθεί υπό N<sub>2</sub> ή CO<sub>2</sub> είχαν υψηλότερα  $L^*$ ,  $h^o$  και WI από τα σπέρματα συσκευασμένα υπό αέρα, ενώ μεταξύ των N<sub>2</sub> και CO<sub>2</sub> οι τιμές των παραμέτρων  $L^*$ ,  $h^o$  και WI ήταν παρόμοιες.

**Πίνακας 2. 8.** Επίδραση της ποικιλίας ( $Pc$ ) επί των παραμέτρων  $L^*$ ,  $h^o$ ,  $C^*$ , WI του χρώματος, τα ολικά φαινολικά (TP) και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας εκτιμούμενης με τις μεθόδους FRAP και DPPH (Γραφήματα 2.1 και 2.2), σε σπέρματα καρυδιών μετά την αποξήρανση και πριν τη συντήρηση, στο Πείραμα Α.

Μεταβλητή	$Pc$	HSD <sup>†</sup>
$L^*$	NS	4,63
$h^o$	**	2,42
$C^*$	***	1,53
WI	*	3,25
TP	***	2,03
FRAP	***	3,88
DPPH	***	4,83

† Έντιμη σημαντική διαφορά (Tukey-HSD test).

NS μη σημαντικό, \* σημαντικό  $P < 0,05$ , \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .



**Πίνακας 2. 9.** Επιδράσεις της ποικιλίας ( $Pc$ ), του χρόνου συντήρησης ( $Ps$ ) και της αλληλεπίδρασής τους ( $Pc \times s$ ) επί των παραμέτρων  $L^*$ ,  $h^o$ ,  $C^*$  και WI του χρώματος (Γραφήματα 2.1 και 2.2), των ολικών φαινολικών (TP) και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), εκτιμούμενη με τις μεθόδους FRAP και DPPH (Γραφήματα 2.3-2.5), σε σπέρματα καρυδιών κατά τη συντήρηση υπό διάφορες συνθήκες, στο Πείραμα Α.

$\Theta^\dagger$	$\Sigma^\dagger$	ΠΠ <sup>†</sup>	Μεταβλητή							
			$L^*$	$h^o$	$C^*$	WI	TP	FRAP	DPPH	
1 <sup>o</sup> C	air	$Pc$	**	***	***	***	***	***	***	***
		$Ps$	***	***	***	***	***	***	***	***
		$Pc \times s$	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	N <sub>2</sub>	$Pc$	***	***	***	***	***	***	***	***
		$Ps$	NS	NS	***	NS	***	***	***	***
		$Pc \times s$	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	CO <sub>2</sub>	$Pc$	**	***	***	***	***	***	***	***
		$Ps$	NS	NS	***	NS	***	***	***	***
		$Pc \times s$	NS	NS	NS	NS	NS	*	*	*
20 <sup>o</sup> C	air	$Pc$	***	***	***	***	***	***	***	***
		$Ps$	***	***	NS	***	***	***	***	***
		$Pc \times s$	NS	NS	*	NS	***	***	***	***
	N <sub>2</sub>	$Pc$	***	***	***	***	***	***	***	***
		$Ps$	*	***	NS	*	***	***	***	***
		$Pc \times s$	NS	NS	**	NS	NS	**	*	*
	CO <sub>2</sub>	$Pc$	**	***	***	***	***	***	***	***
		$Ps$	**	***	NS	**	***	***	***	***
		$Pc \times s$	NS	NS	NS	NS	NS	***	***	***

<sup>†</sup>  $\Theta$ : θερμοκρασία,  $\Sigma$ : είδος συσκευασίας, ΠΠ: πηγή παραλλακτικότητας.

NS μη σημαντικό, \* σημαντικό  $P < 0,05$ , \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

**Πίνακας 2. 10.** Επιδράσεις της ποικιλίας (*Pc*), της θερμοκρασίας συντήρησης (*Pt*) και του αερίου συσκευασίας (*Pg*) επί των παραμέτρων  $L^*$ ,  $h^o$ ,  $C^*$  και WI του χρώματος (Γραφήματα 2.1 και 2.2), σε σπέρματα καρυδιών σε διάφορους χρόνους συντήρησης, στο Πείραμα Α.

ΠΠ †	Μεταβλητή											
	$L^*$			$h^o$			$C^*$			WI		
	Μήνες συντήρησης (mo)											
	4	8	12	4	8	12	4	8	12	4	8	12
<i>Pc</i>	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
<i>Pt</i>	***	***	***	***	***	***	NS	***	***	***	***	***
<i>Pg</i>	***	***	***	***	***	***	NS	NS	NS	***	***	***
<i>Pc</i> × <i>t</i>	NS	NS	*	NS	NS	***	**	**	***	NS	NS	**
<i>Pc</i> × <i>g</i>	NS	NS	**	NS	NS	**	NS	***	***	NS	NS	NS
<i>Pt</i> × <i>g</i>	NS	**	**	NS	***	***	NS	NS	NS	NS	***	**
<i>Pc</i> × <i>t</i> × <i>g</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS

† ΠΠ: πηγή παραλλακτικότητας.

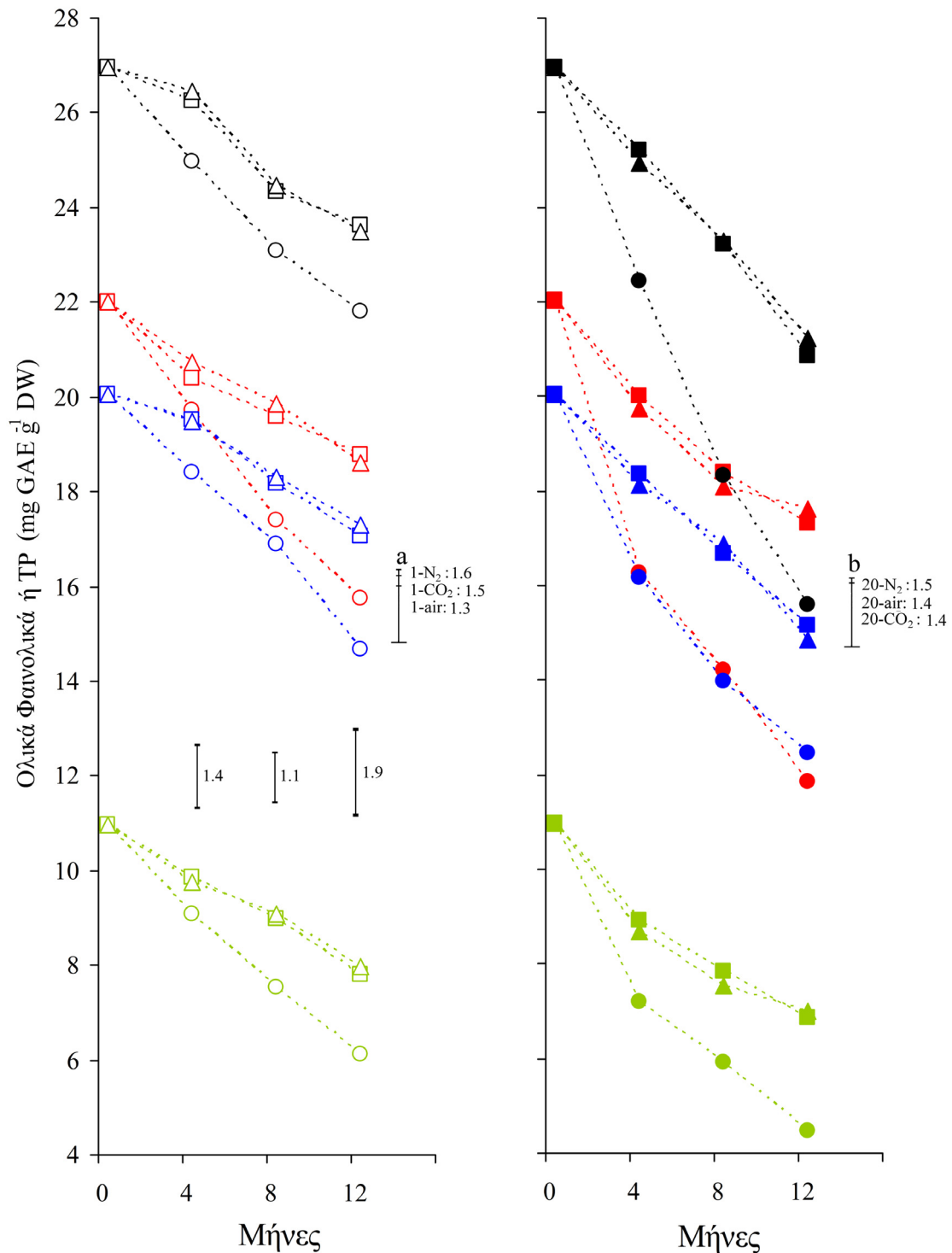
NS μη σημαντικό, \* σημαντικό  $P < 0,05$ , \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

### 2.3.4. Ολικά φαινολικά και αντιοξειδωτική ικανότητα

#### 2.3.4.1. Ολικά φαινολικά (TP)

Πριν τη συντήρηση, η συγκέντρωση των TP μεταξύ των ποικιλιών κυμάνθηκε από ~11 έως ~27 mg GAE g<sup>-1</sup> DW (Γράφημα 2.3, Πίνακας 2.8). Οι υψηλότερες τιμές βρέθηκαν στα σπέρματα της ‘Franquette’, οι χαμηλότερες της ‘Ιόλη’, ενώ ‘Chandler’ και ‘Hartley’ είχαν ενδιάμεσες, αλλά παρόμοιες μεταξύ τους τιμές.

Κατά τη συντήρηση παρατηρήθηκε προοδευτική μείωση των TP με την πάροδο του χρόνου, η οποία ήταν σημαντική σε όλες τις συνθήκες συντήρησης που εξετάστηκαν και είχε παρόμοια τάση για όλες τις ποικιλίες (Γράφημα 2.3, Πίνακας 2.9). Τα σπέρματα που συντηρήθηκαν στους 20° C (20-air, 20-N<sub>2</sub>, 20-CO<sub>2</sub>) και 1-air παρουσίασαν μειωμένες τιμές TP από τους πρώτους 4 mo συντήρησης, ενώ εκείνα που συντηρήθηκαν σε 1-N<sub>2</sub> και 1-CO<sub>2</sub> παρουσίασαν μειωμένες τιμές TP από τους 8 mo και έπειτα. Σε κάθε δειγματοληψία (4, 8, 12 mo), η συντήρηση στην υψηλότερη θερμοκρασία (20° C) ή/και υπό αέρα οδήγησε σε αυξημένες απώλειες TP (Γράφημα 2.3, Πίνακας 2.11). Μάλιστα, η θετική επίδραση της συντήρησης στον 1° C υπό N<sub>2</sub> ή CO<sub>2</sub> ήταν αθροιστική επί του περιορισμού των απωλειών σε TP. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα σπέρματα που συντηρήθηκαν σε 1-air, 20-N<sub>2</sub> και 20-CO<sub>2</sub> είχαν παρόμοια επίπεδα TP καθ όλη τη συντήρηση. Σε όλες τις δειγματοληψίες και για όλες τις ποικιλίες, τα σπέρματα που συντηρήθηκαν υπό N<sub>2</sub> ή CO<sub>2</sub> είχαν παρόμοια επίπεδα TP, υποδεικνύοντας παρόμοιες επιδράσεις για τα δύο αυτά αέρια πλήρωσης των συσκευασιών.



**Γράφημα 2. 3.** Ολικά φαινολικά (TP) στα αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρδιάς συντηρημένα σε συσκευασίες υπό διαφορετικά αέρια (air, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) στον 1° C ή τους 20° C έως 12 mo, στο Πείραμα A. Οι κάθετες μπάρες αντιστοιχούν στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ . Μπάρα (a), από δι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  χρόνος συντήρησης) περιλαμβάνοντας όλους τους μήνες συντήρησης για κάθε συνδυασμό συσκευασίας και θερμοκρασίας; Μπάρες (b<sub>4</sub>, b<sub>8</sub>, b<sub>12</sub>), από τρι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  συσκευασία  $\times$  θερμοκρασία) περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα σε κάθε δειγματοληψία (4, 8, 12 mo).

**Πίνακας 2. 11.** Επιδράσεις της ποικιλίας (*Pc*), της θερμοκρασίας συντήρησης (*Pt*) και του αερίου συσκευασίας (*Pg*) επί των ολικών φαινολικών (TP) και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), εκτιμούμενη με τις μεθόδους FRAP και DPPH (Γραφήματα 2.3-2.5), σε σπέρματα καρυδιών σε διάφορους χρόνους συντήρησης, στο Πείραμα Α.

ΠΠ†	Μεταβλητή								
	TP			FRAP			DPPH		
	Μήνες συντήρησης (mo)								
	4	8	12	4	8	12	4	8	12
<i>Pc</i>	***	***	***	***	***	***	***	***	***
<i>Pt</i>	***	***	***	***	***	***	***	***	***
<i>Pg</i>	***	***	***	***	***	***	***	***	***
<i>Pc</i> × <i>t</i>	NS	*	***	NS	***	***	NS	NS	***
<i>Pc</i> × <i>g</i>	NS	***	*	NS	***	*	**	NS	*
<i>Pt</i> × <i>g</i>	***	***	***	***	***	***	***	**	*
<i>Pc</i> × <i>t</i> × <i>g</i>	NS	***	NS	NS	**	NS	**	NS	NS

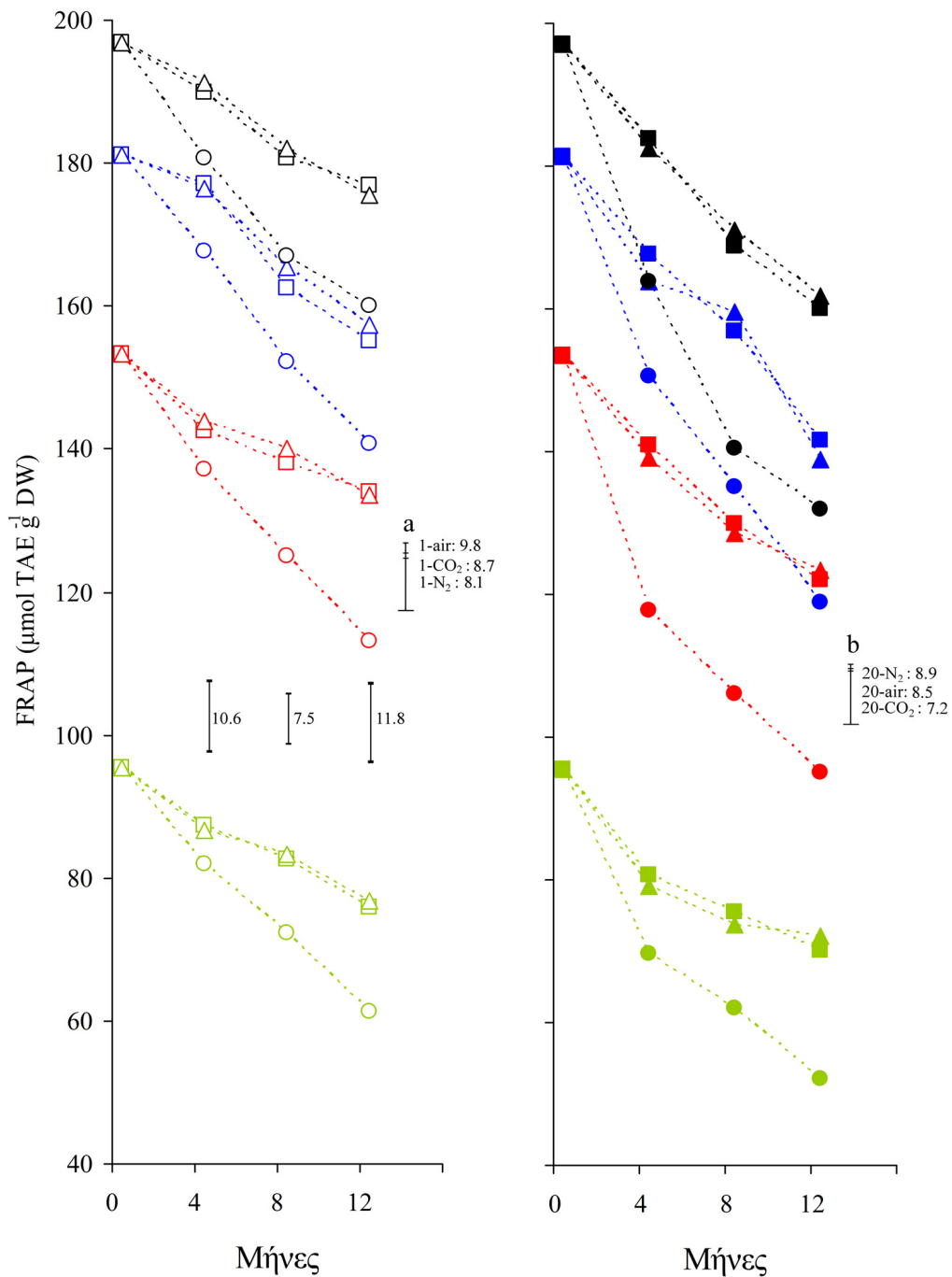
† ΠΠ: πηγή παραλλακτικότητας.

<sup>b</sup> NS: μη σημαντικό, \* σημαντικό  $P < 0,05$ , \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

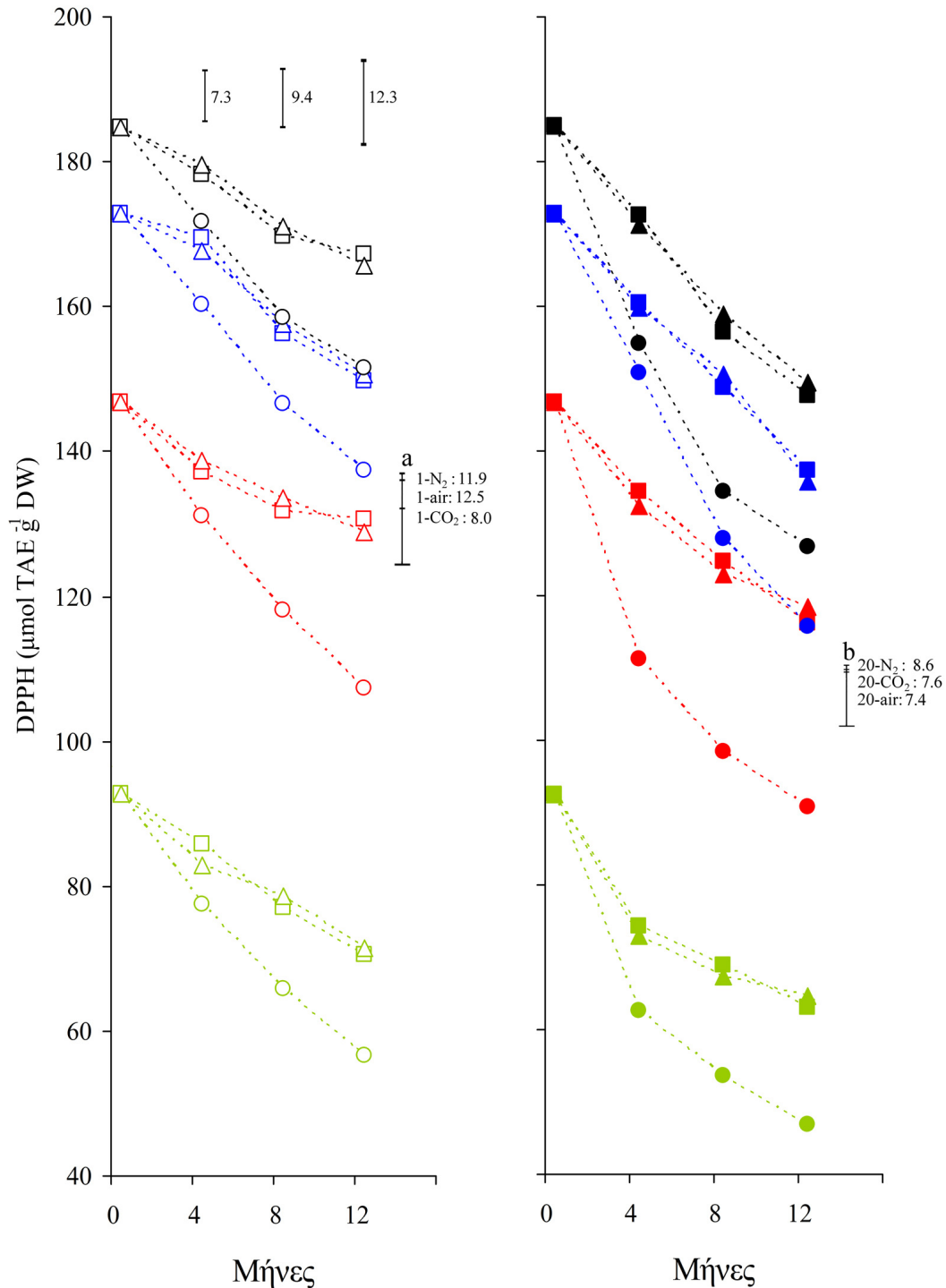
Μετά από 12 mo, οι ποσοστιαίες απώλειες των TP κυμάνθηκαν από ~12% στην ‘Franquette’ σε 1-CO<sub>2</sub> έως ~59% στην ‘Ιόλη’ σε 20-air. Η ‘Ιόλη’ έδειξε τη μεγαλύτερη ευαισθησία στην απώλεια TP, καθώς μετά από 12 mo είχε κατά μέσο όρο 39% απώλειες (σε όλες τις συνθήκες), ενώ στις ‘Chandler’, ‘Franquette’ και ‘Hartley’ οι μέσες απώλειες ήταν 24%, 22% και 24%, αντίστοιχα. Όσον αφορά τη θερμοκρασία, η συντήρηση στους 20° C οδήγησε κατά ~1,5-φορές μεγαλύτερες απώλειες, κατά μέσο όρο (σε όλες τις ποικιλίες και όλες τις ατμόσφαιρες), σε σχέση με τον 1° C. Κατά μέσο όρο και στις δυο θερμοκρασίες, οι απώλειες των TP στις συσκευασίες υπό αέρα ήταν κατά ~1,7-φορές μεγαλύτερες από αυτές στις συσκευασίες είτε υπό N<sub>2</sub> ή υπό CO<sub>2</sub>.

#### 2.3.4.2. Αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

Τα αρχικά επίπεδα της TAC εκτιμούμενης με τη μέθοδο FRAP κυμάνθηκαν μεταξύ ~95-197 μmol TAE g<sup>-1</sup> DW, ενώ με την μέθοδο DPPH κυμάνθηκαν μεταξύ ~93-185 μmol TAE g<sup>-1</sup> DW (Γραφήματα 2.4 και 2.5). Στο σημείο αυτό υπήρξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ποικιλιών (Πίνακας 2.8), με τα επίπεδα της TAC να είναι σε αύξουσα σειρά, ανεξάρτητα από τη μέθοδο εκτίμησης, ‘Franquette’ > ‘Hartley’ > ‘Chandler’ > ‘Ιόλη’.



**Γράφημα 2. 4.** Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), εκτιμούμενη με τη μέθοδο FRAP στα αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρδιάς συντηρημένα σε συσκευασίες υπό διαφορετικά αέρια (air, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) στον 1°C ή τους 20°C έως 12 mo, στο Πείραμα A. Οι κάθετες μπάρες αντιστοιχούν στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ . Μπάρα (a), από δι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία × χρόνος συντήρησης) περιλαμβάνοντας όλους τους μήνες συντήρησης για κάθε συνδυασμό συσκευασίας και θερμοκρασίας; Μπάρες (b<sub>4</sub>, b<sub>8</sub>, b<sub>12</sub>), από τρι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία × συσκευασία × θερμοκρασία) περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα σε κάθε δειγματοληψία (4, 8, 12 mo).



**Γράφημα 2. 5.** Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), εκτιμούμενη με τη μέθοδο DPPH στα αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρδιάς συντηρημένα σε συσκευασίες υπό διαφορετικά αέρια (air, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) στον 1°C ή τους 20°C έως 12 mo, στο Πείραμα Α. Οι κάθετες μπάρες αντιστοιχούν στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ . Μπάρα (a), από δι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  χρόνος συντήρησης) περιλαμβάνοντας όλους τους μήνες συντήρησης για κάθε συνδυασμό συσκευασίας και θερμοκρασίας; Μπάρες (b<sub>4</sub>, b<sub>8</sub>, b<sub>12</sub>), από τρι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  συσκευασία  $\times$  θερμοκρασία) περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα σε κάθε δειγματοληψία (4, 8, 12 mo).

Στα σπέρματα κατά τη συντήρηση, παρατηρήθηκαν μειώσεις στις τιμές τόσο της FRAP όσο και της DPPH, οι οποίες είχαν παρόμοια τάση με τις απώλειες των TP (Γραφήματα 2.4 και 2.5, Πίνακας 2.10). Μάλιστα οι επιδράσεις της ποικιλίας, του χρόνου συντήρησης, της θερμοκρασίας και της συσκευασίας επί των μεταβλητών αυτών ήταν αντίστοιχες με τις επιδράσεις επί των TP (Πίνακας 2.11). Ωστόσο, παρατηρήθηκαν ορισμένες διαφορές μεταξύ των μεταβολών των τιμών της TAC (εκτιμώμενη είτε με τη FRAP ή DPPH) και των TP. Τα σπέρματα της ‘Hartley’ είχαν υψηλότερες τιμές FRAP και DPPH από τα σπέρματα της ‘Chandler’ καθ’ όλη τη συντήρηση, παρόλο που τα επίπεδα TP στην ‘Hartley’ ήταν παρόμοια με επίπεδα στην ‘Chandler’, εξετάζοντάς τα κατ’ αντιστοιχία στις διάφορες συνθήκες συντήρησης. Επίσης, οι ποσοστιαίες απώλειες των επιπέδων της TAC ήταν μικρότερες από τις αντίστοιχες των TP. Συγκεκριμένα μετά από 12 mo, οι μικρότερες απώλειες στις τιμές των FRAP και DPPH βρέθηκαν στην ‘Franquette’ σε 1-CO<sub>2</sub> (10% και 10%, αντίστοιχα), ενώ οι μεγαλύτερες στην ‘Ιόλη’ σε 20-air (45% και 49%, αντίστοιχα). Η συντήρηση στους 20° C οδήγησε σε μέσες απώλειες των επιπέδων FRAP και DPPH κατά ~1,4- και ~1,5-φορές, αντίστοιχα, μεγαλύτερες από εκείνες στη συντήρηση στον 1° C. Ως προς το αέριο πλήρωσης των συσκευασιών, οι μέσες απώλειες των επιπέδων FRAP και DPPH υπό αέρα ήταν κατά ~1,8- και ~1,8-φορές, αντίστοιχα, μεγαλύτερες από αυτές υπό τα άλλα δύο αέρια πλήρωσης.

### 2.3.5. Χαρακτηριστικά καρυδέλαιου

#### 2.3.5.1. Ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) και βαθμός υπεροξειδίων (PV)

Οι αρχικές τιμές των FFA στο καρυδέλαιο ήταν κάτω από 0,025% OL (w/w), για τις τέσσερις ποικιλίες οι οποίες δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους (Γράφημα 2.6, Πίνακας 2.12).

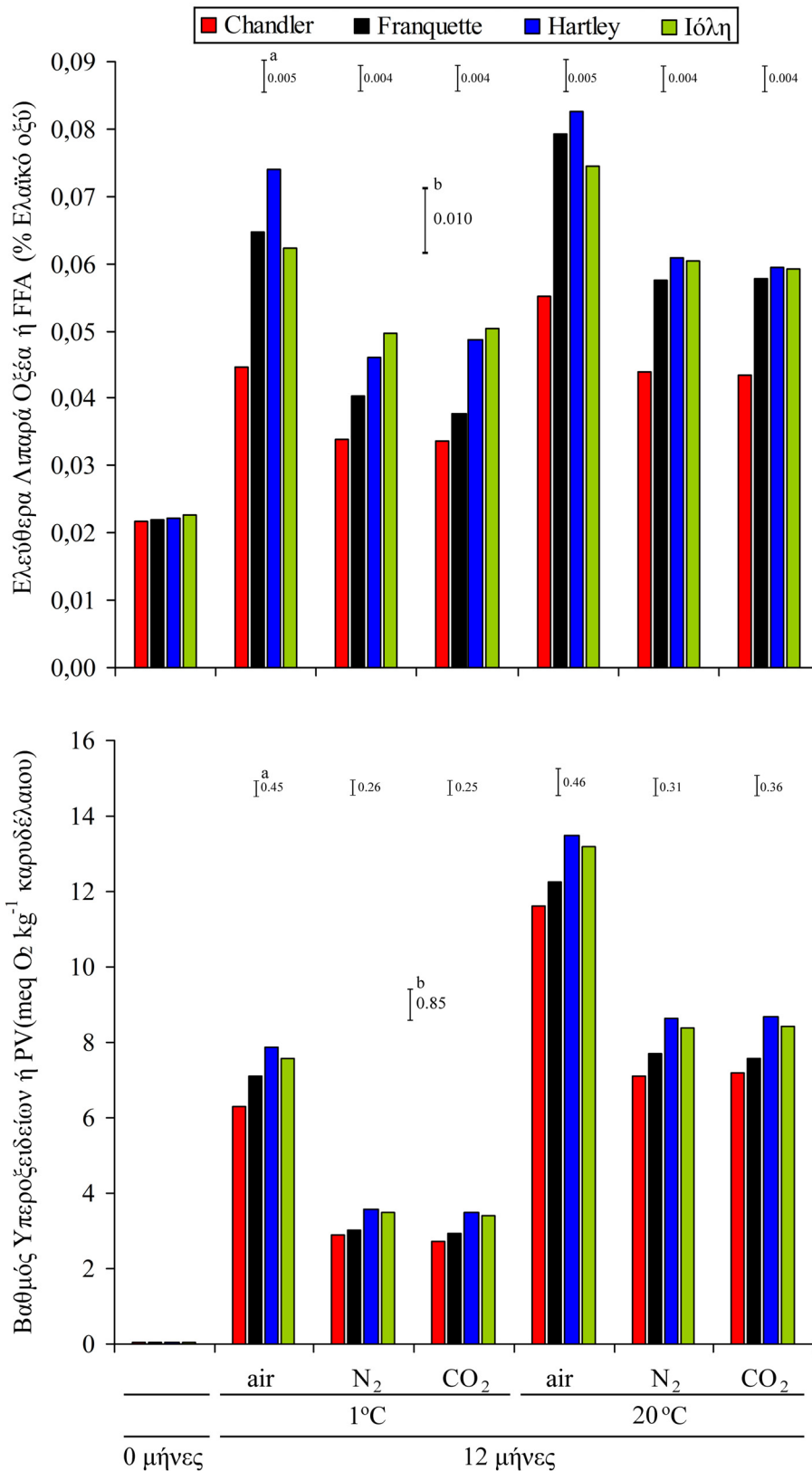
Κατά τη συντήρηση, μεγάλη αύξηση των FFA παρατηρήθηκε, για όλες τις ποικιλίες και υπό όλες τις συνθήκες συντήρησης (Γράφημα 2.6, Πίνακας 2.13), φτάνοντας μετά από 12 mo επίπεδα ~0,055-0,085%. Οι επιδράσεις της ποικιλίας, της θερμοκρασίας και του αερίου συσκευασίας επί των FFA ήταν σημαντικές (Πίνακας 2.14). Στις περισσότερες συνθήκες συντήρησης, το καρυδέλαιο της ‘Chandler’ είχε τα χαμηλότερα επίπεδα FFA, ενώ τα επίπεδα στις υπόλοιπες ποικιλίες ήταν παρόμοια.

**Πίνακας 2. 12.** Επίδραση της ποικιλίας (*Pc*) επί των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) και του βαθμού υπεροξειδίων (PV) (Γράφημα 2.6), στο καρυδέλαιο τεσσάρων ποικιλιών μετά την αποξήρανση και πριν τη συντήρηση, στο Πείραμα Β.

Μεταβλητή	<i>Pc</i>	HSD †
FFA	NS	0,004
PV	NS	0,019

† Έντιμη σημαντική διαφορά (Tukey-HSD test)

NS μη σημαντικό.



**Γράφημα 2. 6.** Ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) και βαθμός υπεροξειδίων (PV) στο καρυδέλαιο αποξηραμένων σπερμάτων τεσσάρων ποικιλιών καρδιάς συντηρημένα σε συσκευασίες υπό διαφορετικά αέρια (air, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) στον 1°C ή τους 20°C έως 12 mo, στο Πείραμα Β. Οι κάθετες μπάρες αντιστοιχούν στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ . Μπάρες (a), από δι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία × χρόνος συντήρησης) περιλαμβάνοντας όλους τους μήνες συντήρησης για κάθε συνδυασμό συσκευασίας και θερμοκρασίας; Μπάρα (b), από τρι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία × συσκευασία × θερμοκρασία) περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα μετά από 12 mo.



Όσον αφορά τη θερμοκρασία συντήρησης, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα FFA στο καρυδέλαιο των σπερμάτων που συντηρήθηκαν στον 1° C σε σχέση με αυτά στους 20° C. Επίσης, τα σπέρματα που είχαν συσκευαστεί υπό αέρα είχαν υψηλότερες τιμές FFA στο καρυδέλαιο σε σχέση με αυτά που είχαν συσκευαστεί υπό N<sub>2</sub> ή CO<sub>2</sub>. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ συσκευασίας υπό N<sub>2</sub> και CO<sub>2</sub>. Η επίδραση της χαμηλής θερμοκρασίας και της πλήρωσης των συσκευασιών με N<sub>2</sub> και CO<sub>2</sub> στον περιορισμό της αύξησης των FFA στο καρυδέλαιο ήταν προσθετική, με τα χαμηλότερα επίπεδα FFA να παρατηρούνται στα 1-N<sub>2</sub> και 1-CO<sub>2</sub>, τα οποία δεν ξεπέρασαν για καμιά ποικιλία το 0,05%. Τα μέσα επίπεδα FFA στο καρυδέλαιο των σπερμάτων που συντηρήθηκαν στους 20° C ήταν κατά ~1,3-φορές υψηλότερα από των σπέρματα στον 1° C. Επίσης, στα σπέρματα συσκευασμένα υπό αέρα βρέθηκαν μέσα επίπεδα FFA ~1,4-φορές υψηλότερα από τα μέσα επίπεδα είτε υπό N<sub>2</sub> είτε υπό CO<sub>2</sub>.

Οι αρχικές τιμές του PV ήταν παρόμοιες μεταξύ των τεσσάρων ποικιλιών κυμαινόμενες από 0,038 έως 0,048 meq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> καρυδέλαιου (Γράφημα 2.6, Πίνακας 2.12). Η συντήρηση των σπερμάτων οδήγησε σε δραματική αύξηση του PV όλων των ποικιλιών και υπό όλες τις συνθήκες συντήρησης (Γράφημα 2.6, Πίνακας 2.13). Μετά από 12 mo τα επίπεδα του PV ήταν ~2,7-13,5 meq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> καρυδέλαιου. Η ποικιλία, η θερμοκρασία και το αέριο συσκευασίας είχαν σημαντική επίδραση επί του PV και παρόμοια με αυτή επί των FFA (Πίνακας 2.14). Τα μέσα επίπεδα PV στο καρυδέλαιο των σπερμάτων που συντηρήθηκαν στους 20° C ήταν κατά ~2,1-φορές υψηλότερα από των σπερμάτων στον 1° C. Επίσης, στα σπέρματα συσκευασμένα υπό αέρα βρέθηκαν μέσα επίπεδα PV ~1,8-φορές υψηλότερα από τα μέσα επίπεδα είτε υπό N<sub>2</sub> ή υπό CO<sub>2</sub>.

**Πίνακας 2. 13.** Επιδράσεις της ποικιλίας (*Pc*) και του χρόνου συντήρησης (*Ps*) επί των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) και του βαθμού υπεροξειδίων (PV) (Γράφημα 2.6), στο καρυδέλαιο τεσσάρων ποικιλιών κατά τη συντήρηση υπό διάφορες συνθήκες, στο Πείραμα Β.

Θ <sup>†</sup>	Σ <sup>†</sup>	ΠΠ <sup>†</sup>	Μεταβλητή	
			FFA	PV
1° C	air	<i>Pc</i>	***	***
		<i>Ps</i>	***	***
		<i>Pc</i> × <i>s</i>	***	***
	N <sub>2</sub>	<i>Pc</i>	***	***
		<i>Ps</i>	***	***
		<i>Pc</i> × <i>s</i>	***	***
	CO <sub>2</sub>	<i>Pc</i>	***	***
		<i>Ps</i>	***	***
		<i>Pc</i> × <i>s</i>	***	***
20° C	air	<i>Pc</i>	***	***
		<i>Ps</i>	***	***
		<i>Pc</i> × <i>s</i>	***	***
	N <sub>2</sub>	<i>Pc</i>	***	***
		<i>Ps</i>	***	***
		<i>Pc</i> × <i>s</i>	***	***
	CO <sub>2</sub>	<i>Pc</i>	***	***
		<i>Ps</i>	***	***
		<i>Pc</i> × <i>s</i>	***	***

<sup>†</sup> Θ: θερμοκρασία, Σ: είδος συσκευασίας, ΠΠ: πηγή παραλλακτικότητας.  
\*\*\* σημαντικό *P* < 0,001.

**Πίνακας 2. 14.** Επιδράσεις της ποικιλίας (*Pc*), της θερμοκρασίας συντήρησης (*Pt*) και του αερίου συσκευασίας (*Pg*) επί των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) και του βαθμού υπεροξειδίων (PV) του καρυδέλαιου (Γράφημα 2.6), σε σπέρματα καρυδιών μετά από 12 mo συντήρησης, στο Πείραμα Β.

ΠΠ <sup>†</sup>	Μεταβλητή	
	FFA	PV
<i>Pc</i>	***	***
<i>Pt</i>	***	***
<i>Pg</i>	***	***
<i>Pc</i> × <i>t</i>	***	**
<i>Pc</i> × <i>g</i>	***	NS
<i>Pt</i> × <i>g</i>	NS	***
<i>Pc</i> × <i>t</i> × <i>g</i>	NS	NS

<sup>†</sup> ΠΠ: πηγή παραλλακτικότητας.

NS μη σημαντικό, \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

### 2.3.5.2. Λιπαρά οξέα

Στο καρυδέλαιο των τεσσάρων ποικιλιών προσδιορίστηκαν τα λιπαρά οξέα (FA) μυριστικό (MY), παλμιτικό (PA), παλμιτελαϊκό (PO), στεαρικό (ST), ελαϊκό (OL), βαχενικό (VA), λινολεϊκό (LL), λινολενικό (LN), αραχιδικό (AR) και γονδοϊκό (GO) (Γραφήματα 2.7-2.9). Πριν τη συντήρηση, η σύσταση του καρυδέλαιου ήταν ~97-98% σε ολικά FA (TFA) (Γράφημα 2.10). Το κύριο ποσοστό του καρυδέλαιου αποτελούταν από ακόρεστα FA (UFA) σε ποσοστό ~85-88% και δευτερευόντως από κορεσμένα (SFA) σε ποσοστό ~10-12% (Γράφημα 2.11). Τα πολύ-ακόρεστα FA (PUFA) ήταν το κύριο κλάσμα των UFA σε ποσοστό 65-72%, με το LL να βρίσκεται στα υψηλότερα ποσοστά (~50-56%) και το LN σε χαμηλότερα ποσοστά (~10-18%) (Γράφημα 2.9). Μεταξύ των MUFA το OL καταλάμβανε τα υψηλότερα ποσοστά (~17-21%) (Γράφημα 2.8), ενώ PA (~7-10%) και ST (~3%) ήταν τα κύρια SFA (Γράφημα 2.7). Τα υπόλοιπα FA βρέθηκαν σε ποσοστά μικρότερα του 1% (Γραφήματα 2.7 και 2.8). Με

βάση την παραπάνω σύσταση, οι λόγοι ακόρεστων/κορεσμένα (UFA/SFA) και  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 FA ήταν ~7-9 και ~0,18-0,30, αντίστοιχα (Γράφημα 2.10). Σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ποικιλιών βρέθηκαν για όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά του καρυδέλαιου πλην των TFA, MY και VAC (Πίνακες 2.15 και 2.16). Συγκεκριμένα, η ‘Chandler’ είχε τα υψηλότερα PUFA, LN,  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 και τα χαμηλότερα MUFA και OL. Η ‘Franquette’ είχε το υψηλότερο PO και τα χαμηλότερα ST, AR και GO. Η ‘Hartley’ είχε τα υψηλότερα SFA, GO και τα χαμηλότερα LL και UFA/SFA. Τέλος η ‘Ιόλη’ είχε τα υψηλότερα MUFA, OL και τα χαμηλότερα LN και  $\omega$ -3/ $\omega$ -6.

**Πίνακας 2. 15.** Επιδράσεις της ποικιλίας (*Pc*) επί των λιπαρών οξέων (Γραφήματα 2.7-2.9), στο καρυδέλαιο τεσσάρων ποικιλιών μετά την αποξήρανση και πριν τη συντήρηση, στο Πείραμα Β.

ΠΠ <sup>†</sup>	Μεταβλητή									
	MY	PA	PO	ST	OL	VAC	LL	LN	AR	GO
<i>Pc</i>	NS	***	***	***	***	NS	***	***	**	***
HSD <sup>††</sup>	0,012	0,54	0,031	0,32	1,58	0,234	1,71	0,49	0,025	0,039

<sup>†</sup> ΠΠ: πηγή παραλλακτικότητας.

<sup>††</sup> Έντιμη σημαντική διαφορά (Tukey-HSD test).

NS μη σημαντικό, \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

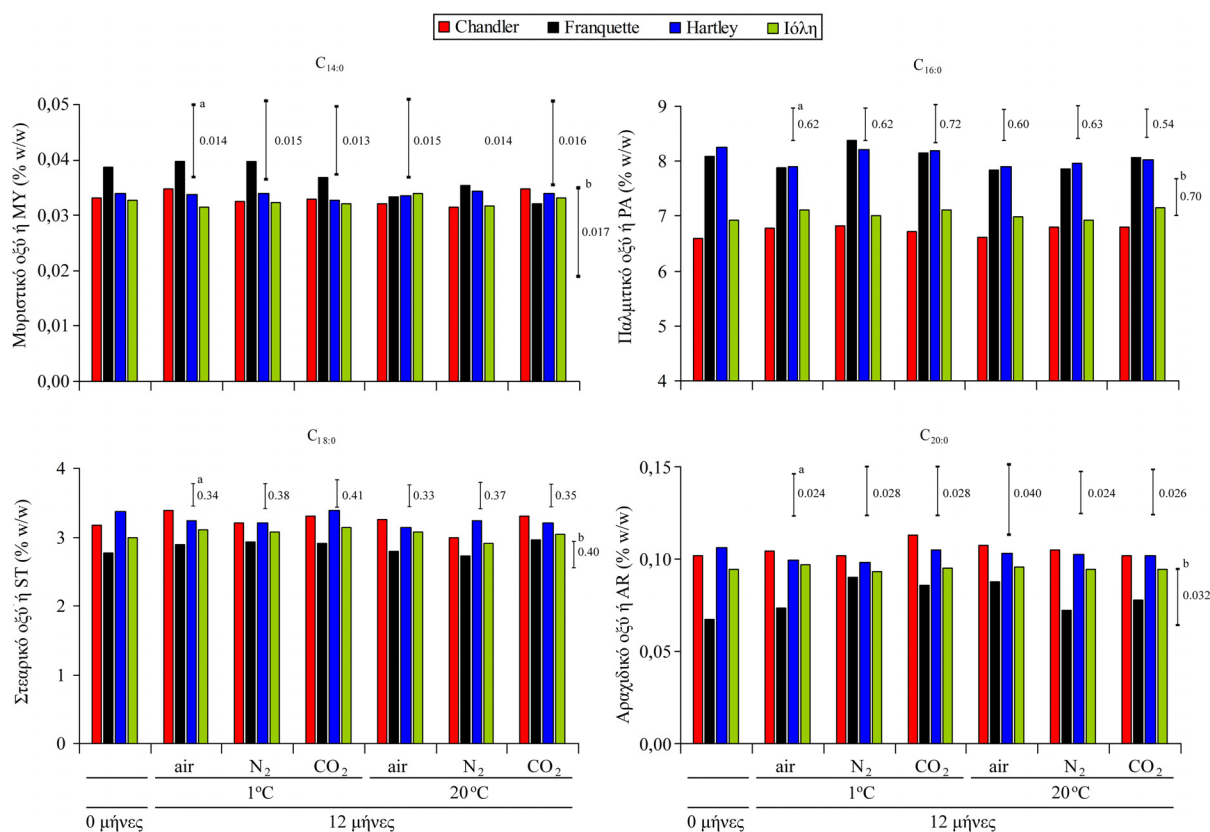
**Πίνακας 2. 16.** Επιδράσεις της ποικιλίας (*Pc*) επί των κλασμάτων λιπαρών οξέων (Γραφήματα 2.10 και 2.11), στο καρυδέλαιο τεσσάρων ποικιλιών μετά την αποξήρανση και πριν τη συντήρηση, στο Πείραμα Β.

ΠΠ <sup>†</sup>	Μεταβλητή						
	TFA	SFA	UFA	MUFA	PUFA	UFA/SFA	ω3/ω6
<i>Pc</i>	NS	***	*	***	***	***	***
HSD <sup>††</sup>	2,15	0,52	2,14	1,55	1,93	0,48	0,011

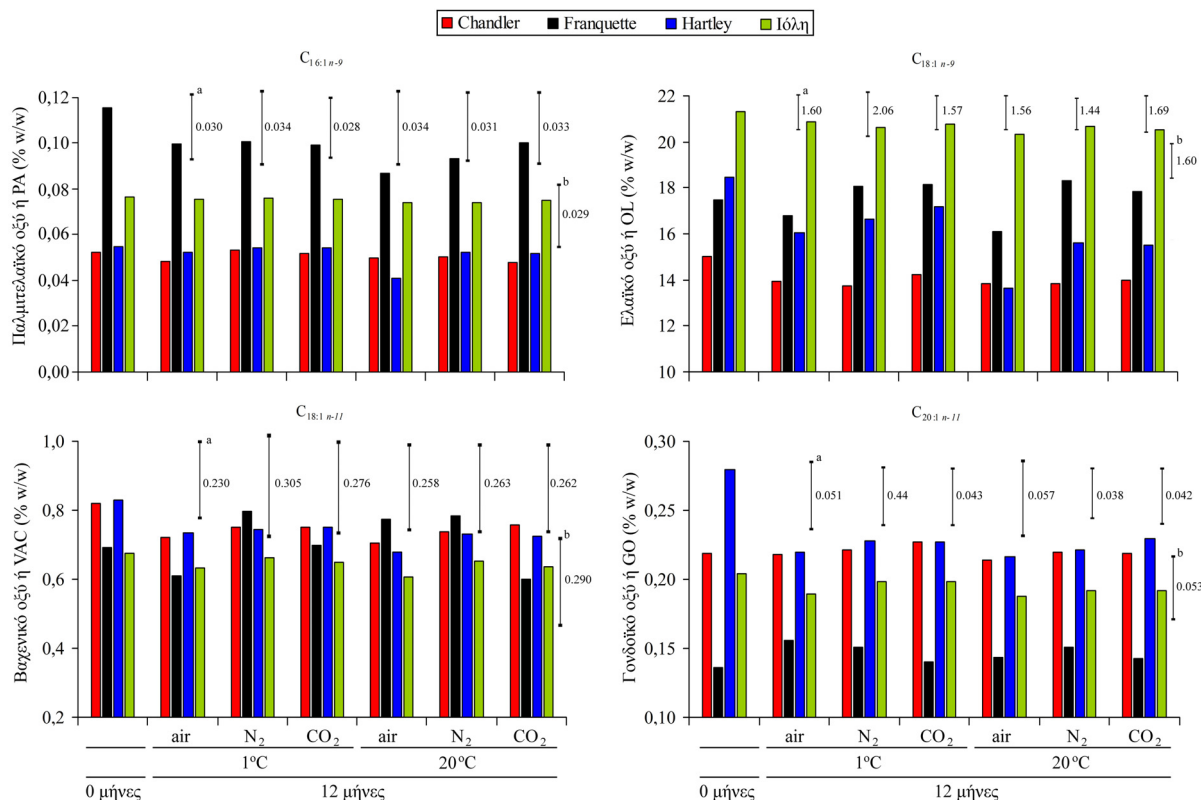
<sup>†</sup> ΠΠ: πηγή παραλλακτικότητας.

<sup>††</sup> Έντιμη σημαντική διαφορά (Tukey-HSD test).

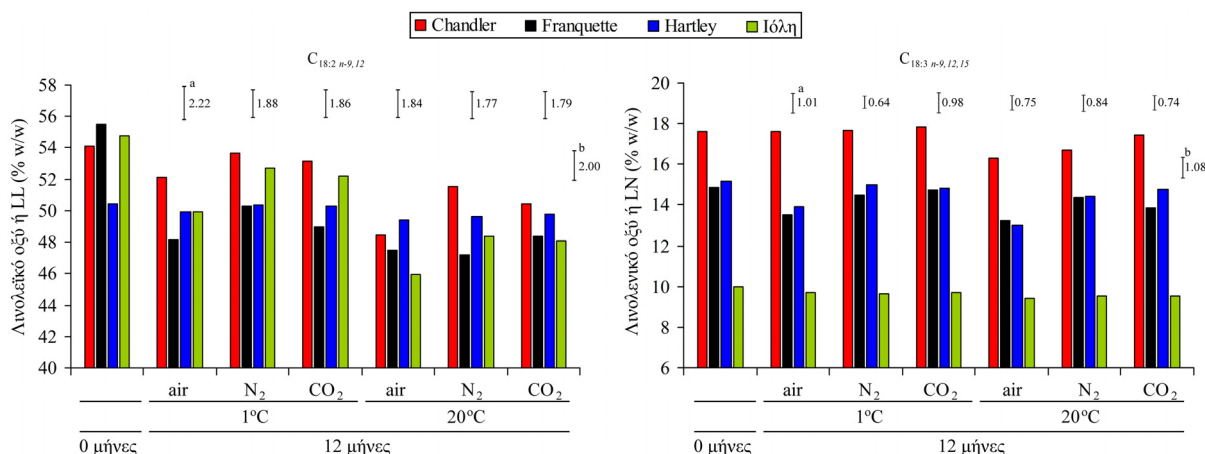
NS μη σημαντικό, \* σημαντικό  $P < 0,05$ , \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .



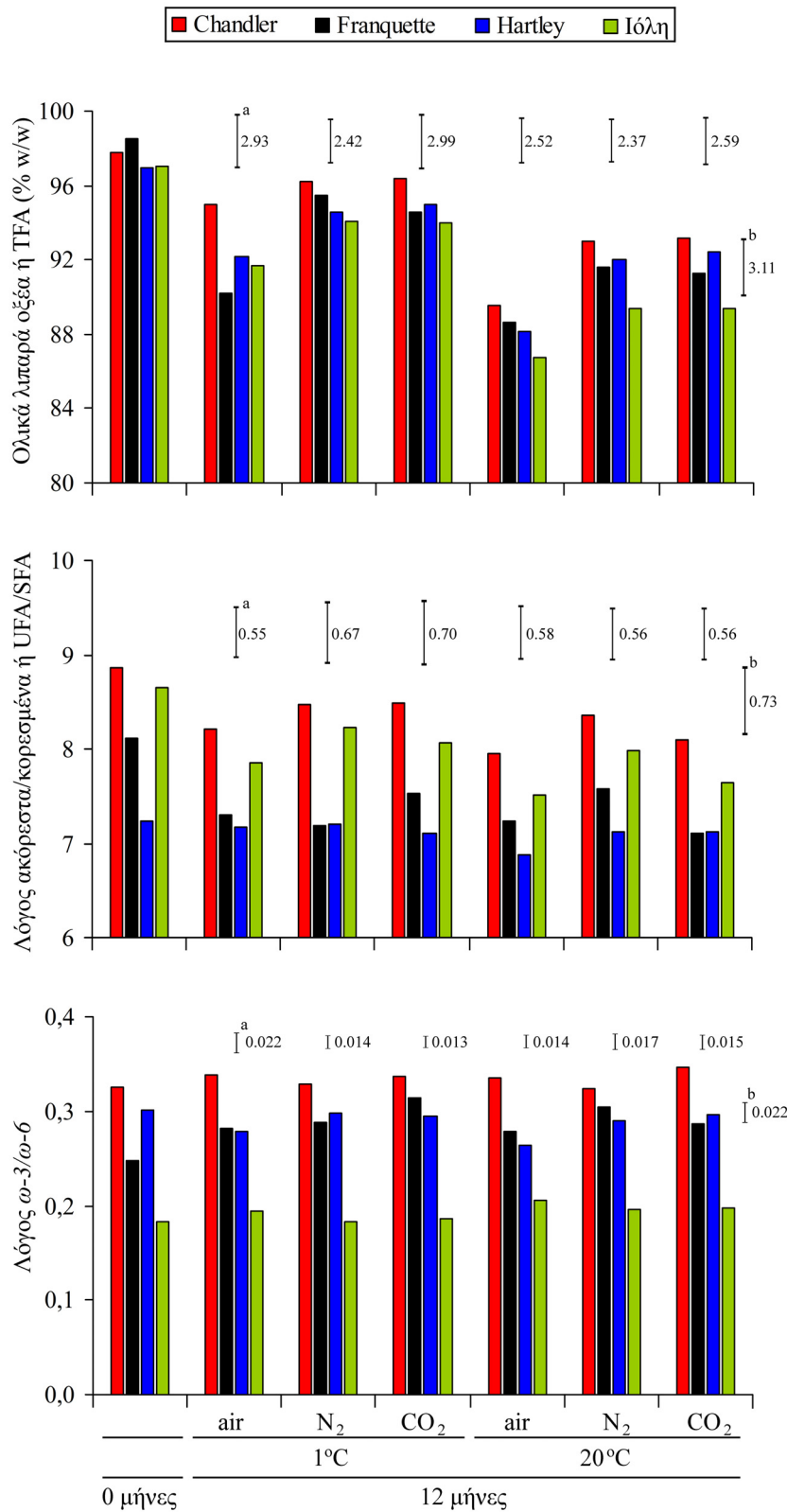
**Γράφημα 2. 7.** Κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA) στο καρυδέλαιο αποξηραμένων σπερμάτων τεσσάρων ποικιλιών καρδιάς συντηρημένα σε συσκευασίες υπό διαφορετικά αέρια (air, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) στον 1°C ή τους 20°C έως 12 mo, στο Πείραμα Β. Οι κάθετες μπάρες αντιστοιχούν στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ . Μπάρες (a), από δι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία × χρόνος συντήρησης) περιλαμβάνοντας όλους τους μήνες συντήρησης για κάθε συνδυασμό συσκευασίας και θερμοκρασίας; Μπάρα (b), από τρι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία × συσκευασία × θερμοκρασία) περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα μετά από 12 mo.



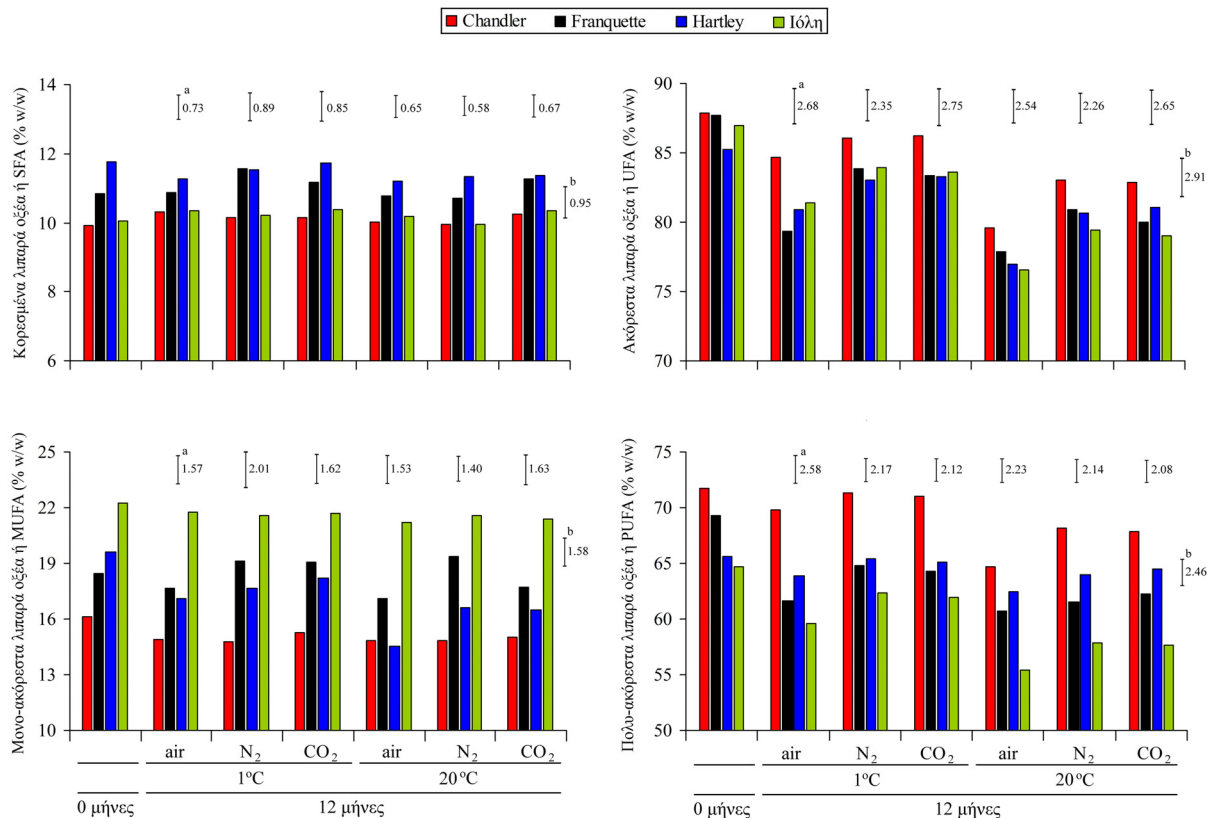
**Γράφημα 2. 8.** Μονο-ακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA) στο καρυδέλαιο αποξηραμένων σπερμάτων τεσσάρων ποικιλιών συντηρημένα σε συσκευασίες υπό διαφορετικά αέρια (air, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) στον 1<sup>ο</sup> C ή τους 20<sup>ο</sup> C έως 12 μο, στο Πείραμα Β. Οι κάθετες μπάρες αντιστοιχούν στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ . Μπάρες (a), από δι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  χρόνος συντήρησης) περιλαμβάνοντας όλους του μήνες συντήρησης για κάθε συνδυασμό συσκευασίας και θερμοκρασίας; Μπάρα (b), από τρι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  συσκευασία  $\times$  θερμοκρασία) περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα μετά από 12 μο.



**Γράφημα 2. 9.** Πολύ-ακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) στο καρυδέλαιο αποξηραμένων σπερμάτων τεσσάρων ποικιλιών συντηρημένα σε συσκευασίες υπό διαφορετικά αέρια (air, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) στον 1<sup>ο</sup> C ή τους 20<sup>ο</sup> C έως 12 μο, στο Πείραμα Β. Οι κάθετες μπάρες αντιστοιχούν στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ . Μπάρες (a), από δι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  χρόνος συντήρησης) περιλαμβάνοντας όλους τους μήνες συντήρησης για κάθε συνδυασμό συσκευασίας και θερμοκρασίας; Μπάρα (b), από τρι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  συσκευασία  $\times$  θερμοκρασία) περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα μετά από 12 μο.



**Γράφημα 2. 10.** Ολικά λιπαρά οξέα (TFA), λόγοι ακόρεστων/κορεσμένων (UFA/SFA) και  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 λιπαρών οξέων στο καρυδέλαιο αποξηραμένων σπερμάτων τεσσάρων ποικιλιών συντηρημένα σε συσκευασίες υπό διαφορετικά αέρια (air, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) στον 1° C ή τους 20° C έως 12 mo, στο Πείραμα Β. Οι κάθετες μπάρες αντιστοιχούν στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ . Μπάρες (a), από δι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  χρόνος συντήρησης) περιλαμβάνοντας όλους τους μήνες συντήρησης για κάθε συνδυασμό συσκευασίας και θερμοκρασίας; Μπάρα (b), από τρι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  συσκευασία  $\times$  θερμοκρασία) περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα μετά από 12 mo.



**Γράφημα 2. 11.** SFA, UFA, MUFA, PUFA στο καρυδέλαιο αποξηραμένων σπερμάτων τεσσάρων ποικιλιών συντηρημένα σε συσκευασίες υπό διαφορετικά αέρια (air, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) στον 1° C ή τους 20° C έως 12 mo, στο Πείραμα Β. Οι κάθετες μπάρες αντιστοιχούν στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ . Μπάρες (a), από δι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  χρόνος συντήρησης) περιλαμβάνοντας όλους τους μήνες συντήρησης για κάθε συνδυασμό συσκευασίας και θερμοκρασίας; Μπάρα (b), από τρι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  συσκευασία  $\times$  θερμοκρασία) περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα μετά από 12 mo.

Κατά τη συντήρηση, παρατηρήθηκε μείωση των TFA στο καρυδέλαιο κυμαινόμενη από ~2 έως ~11% ανάλογα με την ποικιλία και τις συνθήκες συντήρησης (Γράφημα 2.10, Πίνακας 2.18). Η παραπάνω μείωση προήλθε από τη μείωση του ποσοστού των UFA καθώς το ποσοστό των SFA δεν μεταβλήθηκε καθ' όλη τη 12-μο συντήρηση (Γραφήματα 2.7 και 2.11, Πίνακες 2.17 και 2.18). Συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα του καρυδέλαιου στα κορεσμένα οξέα MY, PA, ST και AR δεν μεταβλήθηκε κατά τη συντήρηση σε όλες τις συνθήκες και για όλες τις ποικιλίες. Αντίθετα, μείωση των MUFA και PUFA οδήγησε σε μείωση των UFA της τάξης του ~2-12% (Γράφημα 2.11, Πίνακας 2.18). Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις οι μειώσεις ήταν σημαντικές σε όλες τις συνθήκες συντήρησης.

Αναλυτικότερα, η μείωση των MUFA είχε μεγάλη διακύμανση φτάνοντας έως και το 25% στην 'Hartley' στους 20-air, με μέση απώλεια για όλες τις περιπτώσεις των ποικιλιών και των συνθηκών συντήρησης ~7%. Η μείωση αυτή προήλθε από μείωση της περιεκτικότητας του OL ή οποία ήταν παρόμοια με των MUFA και σημαντική για όλες τις συνθήκες συντήρησης. Το PO μειώθηκε μόνο στους 20-air, το GO μειώθηκε σε όλες τις συνθήκες στους 20° C, ενώ το VAC δεν μεταβλήθηκε κατά τη 12-μο συντήρηση (Γράφημα

2.8, Πίνακας 2.17). Οι μεταβολές των PUFA κατά τη συντήρηση είχαν και αυτές μεγάλη διακύμανση καταγράφοντας μείωση έως και ~15% στην 'Ιόλη' στους 20-air, με μέση μείωση για όλες της περιπτώσεις ποικιλιών και συνθηκών συντήρησης ~7%. Οι απώλειες των PUFA προέκυψαν από μειώσεις τόσο του LL (μέση μείωση ~7%) όσο και του LN (μέση μείωση ~4%) (Γραφήματα 2.9 και 2.11, Πίνακες 2.17 και 2.18). Για τα PUFA και το LL οι μειώσεις ήταν σημαντικές σε όλες τις συνθήκες συντήρησης, ενώ για το LN οι μειώσεις αποφεύχθηκαν στον 1° C είτε υπό N<sub>2</sub> ή υπό CO<sub>2</sub>. Οι μεταβολές των παραπάνω συστατικών του καρυδέλαιου κατά τη συντήρηση οδήγησαν σε σημαντική αύξηση του λόγου ω-3/ω-6 και σημαντική μείωση του λόγου UFA/SFA μετά από 12 mo σε όλες τις συνθήκες συντήρησης. Στους 12 mo, ο λόγος ω-3/ω-6 κυμάνθηκε από 0,18 έως 0,35, με μέση τιμή για όλες τις περιπτώσεις 0,28, ενώ ο λόγος UFA/SFA κυμάνθηκε από 6,9 έως 8,5 με μέση τιμή για όλες τις περιπτώσεις 7,6 (Γράφημα 2.10, Πίνακας 2.18).

**Πίνακας 2. 17.** Επιδράσεις της ποικιλίας (*Pc*) και του χρόνου συντήρησης (*Ps*) επί των λιπαρών οξέων του καρυδέλαιου (Γραφήματα 2.7-2.9) σε σπέρματα καρυδιών κατά τη συντήρηση υπό διάφορες συνθήκες, στο Πείραμα Β.

Θ <sup>†</sup>	Σ <sup>†</sup>	ΠΠ <sup>†</sup>	Μεταβλητή									
			MY	PA	PO	ST	OL	VAC	LL	LN	AR	GO
1° C	air	<i>Pc</i>	NS	***	***	***	***	*	***	***	***	***
		<i>Ps</i>	NS	NS	NS	NS	***	NS	***	**	NS	NS
		<i>Pc × s</i>	NS	NS	NS	NS	*	NS	***	*	NS	**
	N <sub>2</sub>	<i>Pc</i>	NS	***	***	***	*	NS	***	***	***	***
		<i>Ps</i>	NS	NS	NS	NS	***	NS	***	NS	NS	NS
		<i>Pc × s</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	***	**	NS	*
	CO <sub>2</sub>	<i>Pc</i>	NS	***	***	***	*	NS	***	***	***	***
		<i>Ps</i>	NS	NS	NS	NS	***	NS	***	NS	NS	NS
		<i>Pc × s</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	***	***	NS	*
20° C	air	<i>Pc</i>	NS	***	***	***	***	NS	***	***	***	***
		<i>Ps</i>	NS	NS	*	NS	***	NS	***	***	NS	*
		<i>Pc × s</i>	NS	NS	NS	NS	***	NS	***	***	NS	*
	N <sub>2</sub>	<i>Pc</i>	NS	***	***	***	***	NS	***	***	***	***
		<i>Ps</i>	NS	NS	NS	NS	***	NS	***	*	NS	*
		<i>Pc × s</i>	NS	NS	NS	NS	***	NS	***	NS	NS	**
	CO <sub>2</sub>	<i>Pc</i>	NS	***	***	***	***	*	***	***	***	***
		<i>Ps</i>	NS	NS	NS	NS	***	NS	***	**	NS	*
		<i>Pc × s</i>	NS	NS	NS	NS	***	NS	***	***	NS	**

<sup>†</sup> Θ: θερμοκρασία, Σ: είδος συσκευασίας, ΠΠ: πηγή παραλλακτικότητας.

NS: μη σημαντικό, \* σημαντικό  $P < 0,05$ , \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

**Πίνακας 2. 18.** Επιδράσεις της ποικιλίας ( $P_c$ ) και του χρόνου συντήρησης ( $P_s$ ) επί των παραμέτρων του καρυδέλαιου (Γραφήματα 2.10 και 2.11) σε σπέρματα καρυδιών κατά τη συντήρηση υπό διάφορες συνθήκες, στο Πείραμα Β.

$\Theta^\dagger$	$\Sigma^\dagger$	ΠΠ <sup>†</sup>	Μεταβλητή							
			TFA	SFA	UFA	MUFA	PUFA	UFA/SFA	$\omega$ -3/ $\omega$ -6	
1° C	air	$P_c$	**	***	***	***	***	***	***	**
		$P_s$	***	NS	***	***	***	***	***	***
		$P_c \times s$	**	*	***	*	***	*	***	**
	N <sub>2</sub>	$P_c$	*	***	***	***	***	***	***	***
		$P_s$	***	NS	***	*	***	***	***	***
		$P_c \times s$	NS	*	NS	*	***	*	***	***
	CO <sub>2</sub>	$P_c$	NS	***	***	***	***	***	***	***
		$P_s$	***	NS	***	*	***	***	***	***
		$P_c \times s$	NS	NS	NS	*	***	NS	***	***
20° C	air	$P_c$	**	***	***	***	***	***	***	***
		$P_s$	***	NS	***	***	***	***	***	***
		$P_c \times s$	NS	NS	NS	***	***	*	***	***
	N <sub>2</sub>	$P_c$	**	***	***	***	***	***	***	***
		$P_s$	***	NS	***	***	***	***	***	***
		$P_c \times s$	*	NS	*	***	***	NS	***	***
	CO <sub>2</sub>	$P_c$	**	***	***	***	***	***	***	***
		$P_s$	***	NS	***	***	***	***	***	***
		$P_c \times s$	*	NS	*	***	***	NS	***	***

<sup>†</sup>  $\Theta$ : θερμοκρασία,  $\Sigma$ : είδος συσκευασίας, ΠΠ: πηγή παραλλακτικότητας.

NS μη σημαντικό, \* σημαντικό  $P < 0,05$ , \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

Μετά από 12 mo, όλοι οι παράγοντες που εξετάστηκαν (ποικιλία, θερμοκρασία, συσκευασία) επηρέασαν σημαντικά ορισμένα συστατικά του καρυδέλαιου (Πίνακες 2.19 και 2.20). Συγκεκριμένα η συντήρηση των σπερμάτων στον 1° C οδήγησε σε υψηλότερες τιμές TFA, UFA, MUFA, PUFA, OL, LL και LN σε σχέση με τα σπέρματα που συντηρήθηκαν στους 20° C. Επίσης τα σπέρματα συσκευασμένα υπό N<sub>2</sub> ή CO<sub>2</sub> είχαν υψηλότερες τιμές των παραπάνω συστατικών στο καρυδέλαιο σε σχέση με αυτό των σπερμάτων που συσκευάστηκαν υπό αέρα, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ N<sub>2</sub> και CO<sub>2</sub>. Μάλιστα η επιδράσεις της θερμοκρασίας και του αερίου συσκευασίας ήταν προσθετικές, ενώ οι δύο αυτοί παράγοντες δεν είχαν επίδραση επί των SFA, MY, PA, PO, ST, VAC, AR και GO. Για όλα τα συστατικά που επηρεάστηκαν σημαντικά οι τιμές τους στις ευνοϊκότερες συνθήκες συντήρησης (1-N<sub>2</sub> ή 1-CO<sub>2</sub>) ήταν υψηλότερες κατά ~1,1-φορές σε σχέση με τις λιγότερο ευνοϊκές συνθήκες (20-air).



Η ποικιλία είχε σημαντική επίδραση επί όλων των χαρακτηριστικών του καρυδέλαιου εκτός του MY. Για τα χαρακτηριστικά (SFA, MY, PA, PO, ST, AR και GO) που δεν επηρεάστηκαν από τους άλλους δυο παράγοντες (θερμοκρασία και συσκευασία) κατά τη συντήρηση η επίδραση της ποικιλίας ήταν παρόμοια με αυτήν πριν τη συντήρηση (0 mo). Ωστόσο, για τα χαρακτηριστικά TFA, UFA, MUFA, PUFA, OL, LL και LN οι διαφορές μεταξύ των ποικιλιών μετά από 12 mo αφορούσαν τόσο σε διαφορές των αρχικών τους τιμών όσο και σε διαφορές στις μεταβολές κατά τη συντήρηση. Συγκριμένα στην ‘Chandler’ παρατηρήθηκαν οι μικρότερες μέσες απώλειες TFA, UFA και LN που ήταν ~4, 5 και 2%, αντίστοιχα. Στην ‘Franquette’ βρέθηκαν οι μικρότερες μέσες απώλειες MUFA (~1%) και OL (~1%), και οι μεγαλύτερες απώλειες TFA (~7%), UFA (~8%), PUFA (~10%) και LL (~13%). Στην ‘Hartley’ βρέθηκαν οι μικρότερες μέσες απώλειες PUFA (~2%) και LL (~1%), και οι μεγαλύτερες απώλειες MUFA (~14%), OL (~14%) και LN (~6%).

**Πίνακας 2. 19.** Επιδράσεις της ποικιλίας ( $P_c$ ) της θερμοκρασίας συντήρησης ( $P_s$ ) και του αερίου συσκευασίας ( $P_g$ ) επί των λιπαρών οξέων (FA) του καρυδέλαιου (Γραφήματα 2.7-2.9), σε σπέρματα καρυδιών μετά από 12 mo συντήρησης, στο Πείραμα Β.

ΠΠ <sup>†</sup>	Μεταβλητή									
	MY	PA	PO	ST	OL	VAC	LL	LN	AR	GO
$P_c$	NS	***	***	***	***	***	***	***	***	***
$P_t$	NS	NS	NS	NS	***	NS	***	***	NS	NS
$P_g$	NS	NS	NS	NS	***	NS	***	***	NS	NS
$P_c \times t$	NS	NS	NS	NS	***	NS	***	*	NS	NS
$P_c \times g$	NS	NS	NS	NS	***	NS	***	***	NS	NS
$P_t \times g$	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS
$P_c \times t \times g$	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	**	NS	NS

<sup>†</sup> ΠΠ: πηγή παραλλακτικότητας.

NS μη σημαντικό, \* σημαντικό  $P < 0,05$ , \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

**Πίνακας 2. 20.** Επιδράσεις της ποικιλίας (*Pc*), της θερμοκρασίας συντήρησης (*Ps*) και του αερίου συσκευασίας (*Pg*) επί των κλασμάτων λιπαρών οξέων (FA) του καρυδέλαιου (Γραφήματα 2.10-2.11), σε σπέρματα καρυδιών μετά από 12 μο συντήρησης, στο Πείραμα Β.

ΠΠ <sup>†</sup>	Μεταβλητή						
	TFA	SFA	UFA	MUFA	PUFA	UFA/SFA	$\omega$ -3/ $\omega$ -6
<i>Pc</i>	***	***	***	***	***	***	***
<i>Pt</i>	***	NS	***	***	***	***	NS
<i>Pg</i>	***	NS	***	***	***	***	NS
<i>Pc</i> × <i>t</i>	*	NS	**	***	***	NS	***
<i>Pc</i> × <i>g</i>	NS	NS	NS	***	NS	NS	***
<i>Pt</i> × <i>g</i>	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS
<i>Pc</i> × <i>t</i> × <i>g</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	***

<sup>†</sup> ΠΠ: πηγή παραλλακτικότητας.

NS μη σημαντικό, \* σημαντικό  $P < 0,05$ , \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

Οι επιδράσεις της θερμοκρασίας και συσκευασίας επί του λόγου UFA/SFA ήταν σημαντικές και παρόμοιες με των FA που μειώθηκαν κατά τη συντήρηση καθώς η χαμηλή θερμοκρασία και η συσκευασία υπό N<sub>2</sub> ή CO<sub>2</sub> περιόρισαν αθροιστικά την πτώση του βαθμού ακορεστότητας (UFA/SFA) στο καρυδέλαιο. Ο λόγος  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 δεν επηρεάστηκε από τη θερμοκρασία συντήρησης και τη συσκευασία παρά μόνο από την ποικιλία, με τις υψηλότερες τιμές να παρατηρούνται στην ‘Chandler’ τις χαμηλότερες στην ‘Ιόλη’, ενώ ‘Franquette’ και ‘Hartley’ είχαν ενδιάμεσες τιμές λόγου  $\omega$ -3/ $\omega$ -6.

### 2.3.6. Σχέσεις μεταξύ των χαρακτηριστικών

#### 2.3.6.1. Αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά και χρώμα

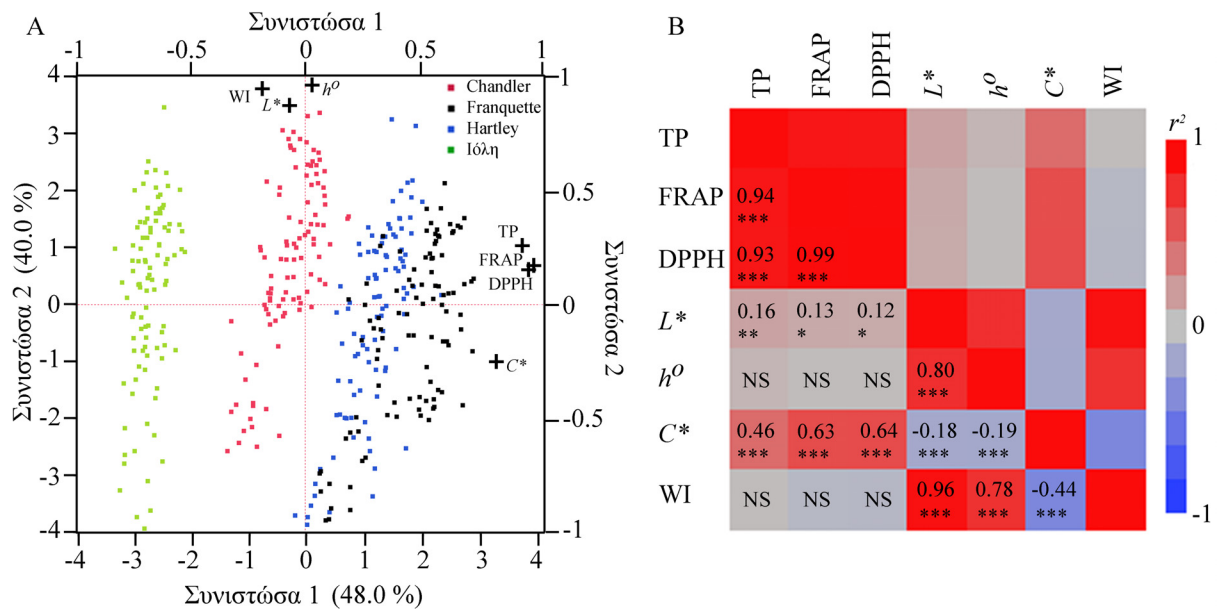
Η PCA έδειξε ότι οι δύο πρώτες ερμηνεύσιμες συνιστώσες εξήγησαν συνολικά το 88,0% της συνολικής διακύμανσης των TP, FRAP, DPPH και των παραμέτρων του χρώματος  $L^*$ ,  $h^o$ ,  $C^*$  και WI (Πίνακας 2.21), δείχνοντας επίσης ορισμένες στενές σχέσεις μεταξύ των παραμέτρων αυτών (Γράφημα 2.12A).

Από την PCA, οι στενότερες σχέσεις μεταξύ των χαρακτηριστικών, παρατηρήθηκαν ανάμεσα στις τρεις αντιοξειδωτικές παραμέτρους (TP, FRAP, DPPH), οι οποίες υποστηρίχθηκαν και από την ανάλυση συσχέτισης έχοντας ανά ζεύγη συντελεστές  $r^2$  άνω του 0,90 (Γράφημα 2.12B). Ωστόσο, στενές σχέσεις μεταξύ αντιοξειδωτικών παραμέτρων και παραμέτρων του χρώματος δεν παρατηρήθηκαν εξετάζοντας την PCA. Από την ανάλυση συσχέτισης παρουσιάστηκαν ορισμένες σημαντικές συσχετίσεις, χωρίς όμως υψηλούς συντελεστές. Οι τέσσερις ποικιλίες διαχωρίστηκαν εμφανώς με βάση το score plot, όπου οι ‘Franquette’ και ‘Hartley’ ήταν εγγύτερα στις θέσεις των TP, FRAP και DPPH, ενώ οι ‘Chandler’ και ‘Ιόλη’ ήταν εγγύτερα στις παραμέτρους  $L^*$ ,  $h^o$ , και WI του χρώματος. Παράλληλα η διασπορά των σημείων της κάθε ποικιλίας στο score plot ήταν παρόμοια μεταξύ των τεσσάρων ποικιλιών. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, η μελέτη των σχέσεων μεταξύ όλων των παραμέτρων μπορεί να ερμηνευθεί με βάση τις πολυμεταβλητές αναλύσεις για κάθε ποικιλία ξεχωριστά. Συγκεκριμένα, οι PCA για κάθε ποικιλία έδειξε, εκτός από τη στενή σχέση μεταξύ των αντιοξειδωτικών παραμέτρων, επιπλέον στενές σχέσεις μεταξύ TP και των τριών παραμέτρων του χρώματος ( $L^*$ ,  $h^o$ , και WI). Οι τελευταίες σχέσεις υποστηρίχθηκαν και από τις αναλύσεις συσχέτισης όπου βρέθηκαν συντελεστές  $r^2=0,72-0,79$  μεταξύ TP και  $L^*$ ,  $r^2=0,81-0,86$  μεταξύ TP και  $h^o$ ,  $r^2=0,67-0,74$  μεταξύ TP και WI (Γράφημα 2.13). Η παράμετρος  $C^*$ , δεν εμφανίστηκε να παρουσιάζει στενή σχέση με τα TP ούτε με βάση τις PCA αλλά ούτε με βάση τις συσχετίσεις.

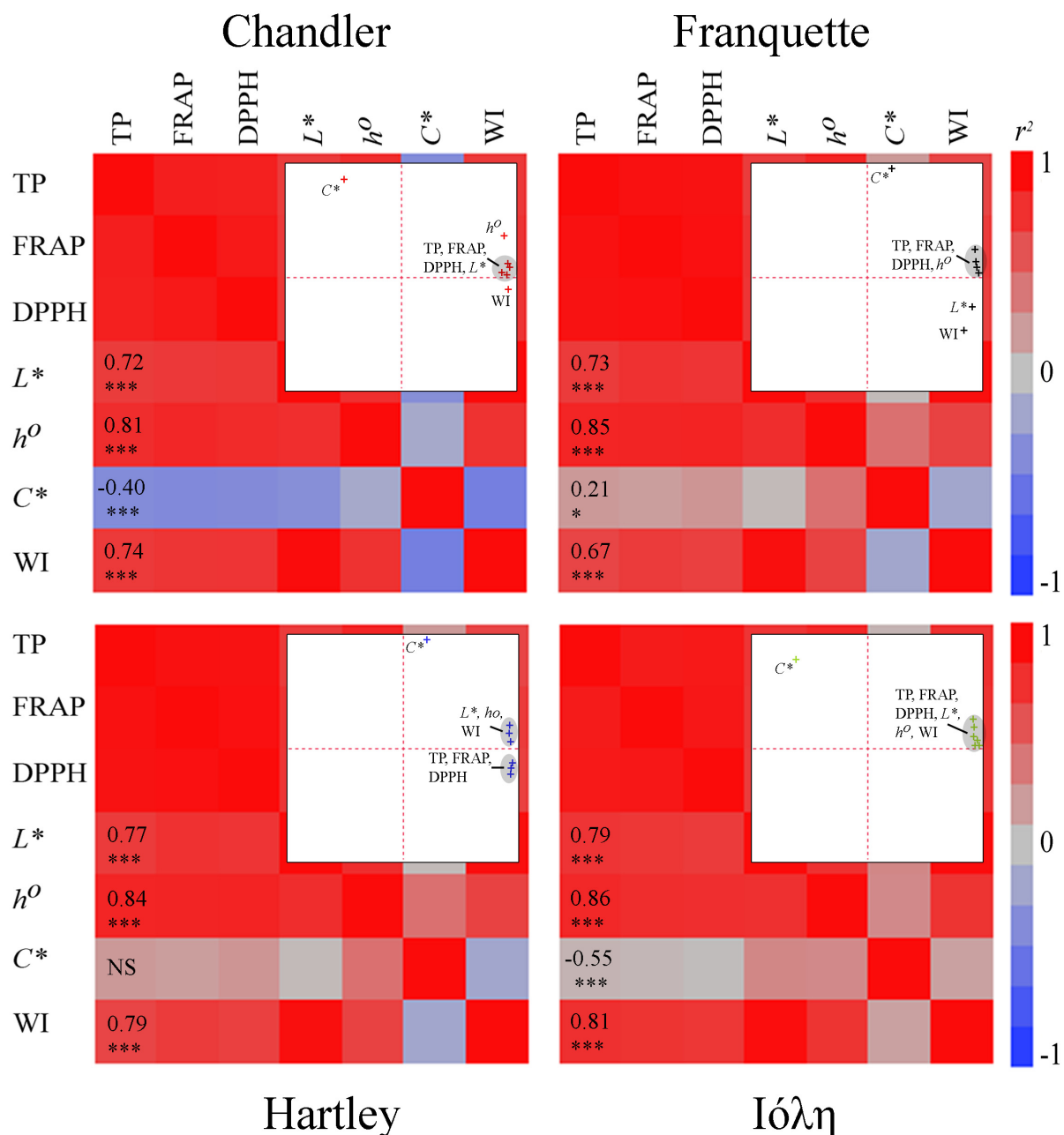
**Πίνακας 2. 21.** Παράμετροι ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) των αντιοξειδωτικών παραμέτρων και των παραμέτρων του χρώματος (Γράφημα 2.12A) στα αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών κατά τη συντήρηση στο Πείραμα Α.

Σ <sup>†</sup> #	Eigenvalue	ΕΔ <sup>†</sup> (%)	ΣΔ <sup>†</sup> (%)
1	3,362	48,0	48,0
2	2,798	40,0	88,0
3	0,538	7,7	95,7
4	0,237	3,4	99,1
5	0,056	0,8	99,9
6	0,009	0,1	100,0
7	0,000	0,0	100,0

<sup>†</sup> Σ: συνιστώσα, ΕΔ: εξηγούμενη διακύμανση, ΣΔ: συνολική εξηγούμενη διακύμανση.



**Γράφημα 2. 12.** (Α) Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) και (Β) ανάλυση συσχέτισης των αντιοξειδωτικών παραμέτρων και των παραμέτρων του χρώματος στα αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρδιάς κατά τη συντήρηση στο Πείραμα Α. Μεταβλητές: ολικά φαινολικά (TP), αντιοξειδωτική ικανότητα εκτιμούμενη με τις μεθόδους FRAP και DPPH, παράμετροι χρώματος ( $L^*$ ,  $h^o$ ,  $C^*$ , WI). Στο (Α): αριστερός και κάτω άξονες αντιστοιχούν στις τιμές των κυρίων συνιστωσών (score plot); δεξιά και επάνω άξονες αντιστοιχούν στους συντελεστές των κυρίων συνιστωσών (loading plot); Τα χρωματιστά τετράγωνα υποδεικνύουν τη θέση του κάθε δείγματος στο score plot; Οι σταυροί υποδεικνύουν τη θέση της κάθε μεταβλητής στο loading plot; Οι τιμές στις παρενθέσεις αντιστοιχούν στο ποσοστό της συνολικής διακύμανσης που εξηγείται από την κάθε συνιστώσα. Στο (Β): χάρτης των συσχετίσεων μεταξύ των μεταβλητών ανά δύο; Για κάθε ζεύγος παραμέτρων δίνεται ο συντελεστής συσχέτισης και η πιθανότητα συσχέτισης; NS μη σημαντικό, \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .



**Γράφημα 2. 13.** Αναλύσεις κύριων συνιστωσών (PCA) και αναλύσεις συσχέτισης των αντιοξειδωτικών παραμέτρων και των παραμέτρων του χρώματος ανά ποικιλία στα αποξηραμένα σπέρματα καρυδιών κατά τη συντήρηση, στο Πείραμα Α. Μεταβλητές: ολικά φαινολικά (TP), αντιοξειδωτική ικανότητα εκτιμούμενη με τις μεθόδους FRAP και DPPH, παράμετροι χρώματος ( $L^*$ ,  $h^o$ ,  $C^*$ , WI). Παρουσιάζεται ο χάρτης των συσχετίσεων μεταξύ των μεταβλητών ανά δύο για κάθε ποικιλία; Για κάθε ζεύγος των TP και των παραμέτρων του χρώματος δίνεται ο συντελεστής συσχέτισης και η πιθανότητα συσχέτισης; NS μη σημαντικό, \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ . Εντός του κάθε χάρτη συσχετίσεων παρατίθεται το γράφημα των συντελεστών (loading plot) από την PCA για κάθε ποικιλία.

### 2.3.6.2. Χαρακτηριστικά καρυδέλαιου

Η PCA έδειξε ότι οι δύο πρώτες ερμηνεύσιμες συνιστώσες εξήγησαν συνολικά το 55,9% της συνολικής διακύμανσης όλων των χαρακτηριστικών του καρυδέλαιου (Πίνακας 2.22). Εξαιρώντας από την ανάλυση όλα τα χαρακτηριστικά που αντιστοιχούν σε κορεσμένα FA που δεν μεταβλήθηκαν κατά τη συντήρηση, οι δυο πρώτες συνιστώσες εξήγησαν το

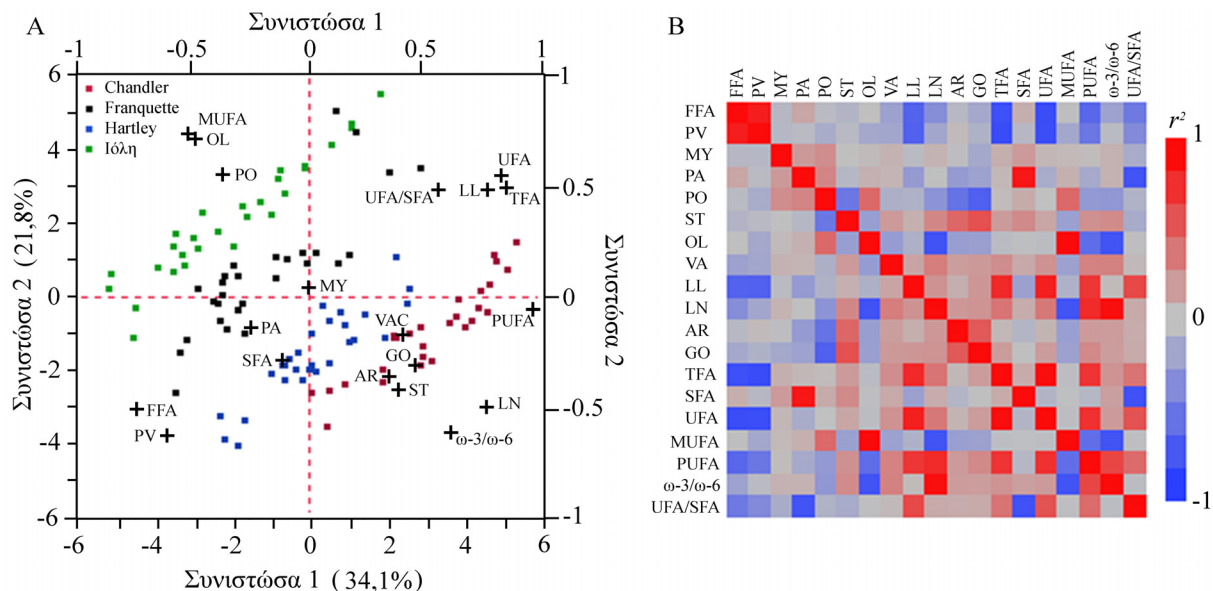
73,0% της συνολικής διακύμανσης των 11 κύριων χαρακτηριστικών (FFA, PV, PO, OL, VAC, LL, LN, GO, UFA, MUFA, PUFA) του καρυδέλαιου (Πίνακας 2.22).

**Πίνακας 2. 22.** Παράμετροι ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) των χαρακτηριστικών του καρυδέλαιου περιλαμβάνοντας είτε όλα (Γράφημα 2.14A) είτε τα κύρια (Γράφημα 2.15A) χαρακτηριστικά στα αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών κατά τη συντήρηση στο Πείραμα Β.

Συνιστώσα #	Όλα τα χαρακτηριστικά καρυδέλαιου			Κύρια χαρακτηριστικά καρυδέλαιου		
	Eigenvalue	ΕΔ <sup>†</sup> (%)	ΣΔ <sup>†</sup> (%)	Eigenvalue	ΕΔ <sup>†</sup> (%)	ΣΔ <sup>†</sup> (%)
1	6,488	34,1	34,1	4,925	44,8	44,8
2	4,136	21,8	55,9	3,109	28,3	73,0
3	2,930	15,4	71,3	1,331	12,1	85,1
4	2,007	10,6	81,9	0,871	7,9	93,1
5	0,978	5,1	87,0	0,380	3,5	96,5
6	0,801	4,2	91,3	0,190	1,7	98,2
7	0,463	2,4	93,7	0,113	1,0	99,3
8	0,453	2,4	96,1	0,081	0,7	100,0
9	0,352	1,9	97,9	0,000	0,0	100,0
10	0,179	0,9	98,9	0,000	0,0	100,0
11	0,150	0,8	99,7	0,000	0,0	100,0
12	0,058	0,3	100,0	-	-	-
13	0,002	0,0	100,0	-	-	-
14	0,001	0,0	100,0	-	-	-
15	0,001	0,0	100,0	-	-	-
16	0,000	0,0	100,0	-	-	-
17	0,000	0,0	100,0	-	-	-
18	0,000	0,0	100,0	-	-	-
19	0,000	0,0	100,0	-	-	-

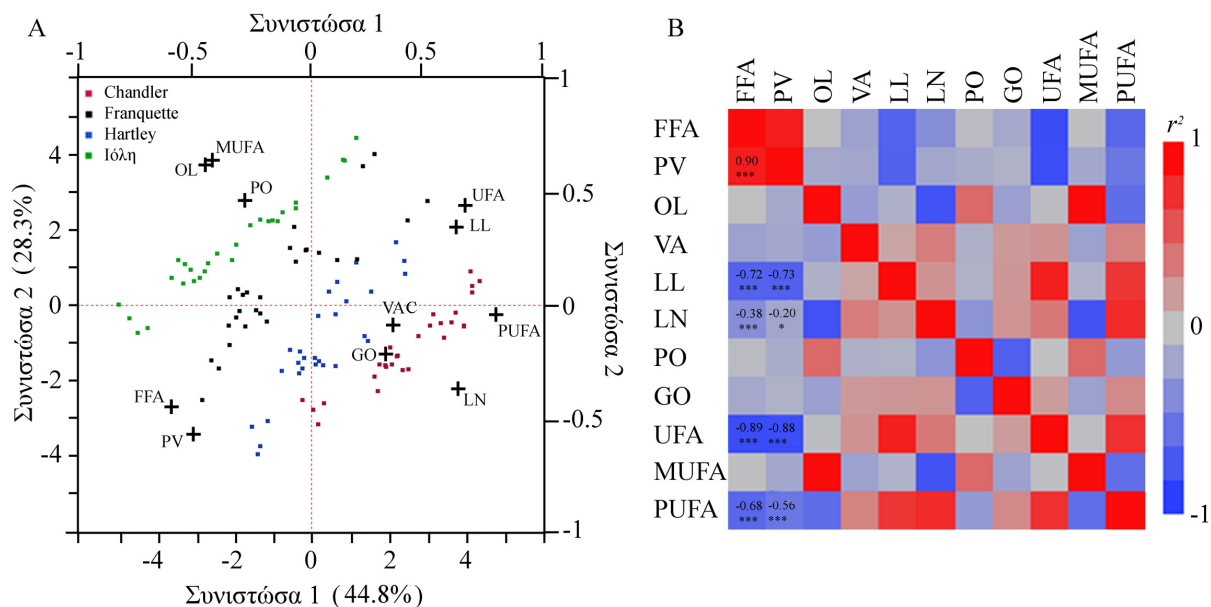
<sup>†</sup> ΕΔ: εξηγούμενη διακύμανση, ΣΔ: συνολική εξηγούμενη διακύμανση.

Οι τέσσερις ποικιλίες διαχωρίστηκαν εμφανώς με βάση τα score plots και των δύο αναλύσεων PCA, όπου η 'Ιόλη' ήταν εγγύτερα στις θέσεις των MUFA, OL, PO, η 'Chandler' στα PUFA, LN, ενώ οι 'Franquette' και 'Hartley' είχαν ενδιάμεσες θέσεις. Παράλληλα η διασπορά των σημείων της κάθε ποικιλίας στο score plot ήταν παρόμοια μεταξύ των τεσσάρων ποικιλιών (Γραφήματα 2.14 και 2.15).



**Γράφημα 2. 14.** (Α) Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) και (Β) ανάλυση συσχέτισης των χαρακτηριστικών του καρυδέλαιου στα αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς κατά τη συντήρηση, στο Πείραμα Β. Μεταβλητές: ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA), βαθμός υπεροξειδίων (PV), ολικά λιπαρά οξέα (TFA), κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA), ακόρεστα λιπαρά οξέα (UFA), μονο-ακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA), πολύ-ακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), μυριστικό (MY), παλμιτικό (PA), παλμιτελαϊκό (PO), στεατικό (ST), ελαϊκό (OL), βαχενικό (VAC), λινολεϊκό (LL), λινολενικό (LN), αραχιδικό (AR), γονδοϊκό (GO), λόγοι  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 και UFA/SFA. Στο (Α): αριστερός και κάτω άξονες αντιστοιχούν στις τιμές των κυρίων συνιστωσών (score plot); δεξιά και επάνω άξονες αντιστοιχούν στους συντελεστές των κυρίων συνιστωσών (loading plot); Τα χρωματιστά τετράγωνα υποδεικνύουν τη θέση του κάθε δείγματος στο score plot; Οι σταυροί υποδεικνύουν τη θέση της κάθε μεταβλητής στο loading plot; Οι τιμές στις παρενθέσεις αντιστοιχούν στο ποσοστό της συνολικής διακύμανσης που εξηγείται από την κάθε συνιστώσα. Στο (Β): χάρτης των συσχετίσεων μεταξύ των μεταβλητών ανά δύο.

Από τις PCA, οι στενότερες σχέσεις μεταξύ των χαρακτηριστικών, παρατηρήθηκαν ανάμεσα στα FFA και PV, ενώ και οι δυο αυτές μεταβλητές είχαν αρνητική σχέση με τα UFA, PUFA, LL, UFA/SFA (Γραφήματα 2.14Α και 2.15Α). Η παραπάνω σχέσεις υποστηρίχθηκαν και από τις αναλύσεις συσχέτισης, με την ανάλυση που δεν περιελάμβανε τα κορεσμένα λιπαρά οξέα να δίνει υψηλότερους συντελεστές  $r^2$  (Γραφήματα 2.14Β και 2.15Β). Συγκεκριμένα, θετική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ FFA και PV ( $r^2=0,90$ ), ενώ και οι δυο αυτές μεταβλητές συσχετίστηκαν αρνητικά με τα UFA, PUFA, LL, LN. Τα UFA έδειξαν την ισχυρότερη αρνητική συσχέτιση με τα FFA και PV ( $r^2= -0,89$  και  $r^2= -0,88$ , αντίστοιχα) ενώ το LN την ασθενέστερη ( $r^2= -0,38$  και  $r^2= -0,20$ , αντίστοιχα).



**Γράφημα 2. 15.** (Α) Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) και (Β) ανάλυση συσχέτισης των χαρακτηριστικών του καρυδέλαιου εξαιρουμένων των κορεσμένων λιπαρών οξέων στα αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρδιάς κατά τη συντήρηση, στο Πείραμα Β. Μεταβλητές: ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA), βαθμός υπεροξειδίου (PV), ακόρεστα λιπαρά οξέα (UFA), μονο-ακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA), πολύ-ακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), παλμιτελαϊκό (PO), ελαϊκό (OL), βαχενικό (VAC), λινολεϊκό (LL), λινολενικό (LN), γονδοϊκό (GO). Στο (Α): αριστερός και κάτω άξονες αντιστοιχούν στις τιμές των κυρίων συνιστωσών (score plot); δεξιάς και επάνω άξονες αντιστοιχούν στους συντελεστές των κυρίων συνιστωσών (loading plot); Τα χρωματιστά τετράγωνα υποδεικνύουν τη θέση του κάθε δείγματος στο score plot; Οι σταυροί υποδεικνύουν τη θέση της κάθε μεταβλητής στο loading plot; Οι τιμές στις παρενθέσεις αντιστοιχούν στο ποσοστό της συνολικής διακύμανσης που εξηγείται από την κάθε συνιστώσα. Στο (Β): χάρτης των συσχετίσεων μεταξύ των μεταβλητών ανά δύο; Για κάθε ζεύγος δίνεται ο συντελεστής συσχέτισης και η πιθανότητα συσχέτισης; \* Σημαντικό  $P < 0,001$ , \*\*\* Σημαντικό  $P < 0,001$ .

### 2.3.6.3. Αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά καρπού και χαρακτηριστικά καρυδέλαιου

Η PCA έδειξε ότι οι δύο πρώτες ερμηνεύσιμες συνιστώσες εξήγησαν συνολικά το 77,1% της συνολικής διακύμανσης των TP, FRAP, DPPH και των παραμέτρων του καρυδέλαιου FFA, PV, OL, LL, LN, TFA, SFA, UFA, MUFA, PUFA (Πίνακας 2.23), δείχνοντας επίσης ορισμένες στενές σχέσεις μεταξύ των παραμέτρων αυτών (Γράφημα 2.16Α).

Από την PCA, οι σχέσεις των αντιοξειδωτικών παραμέτρων μεταξύ τους, καθώς και των χαρακτηριστικών του καρυδέλαιου μεταξύ τους, ήταν παρόμοιες με τις σχέσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω (παράγραφοι 2.3.6.1 και 2.3.6.2). Παράλληλα όμως από την παρούσα ανάλυση αποκαλύφθηκαν και ορισμένες σχέσεις ανάμεσα στις αντιοξειδωτικές παραμέτρους με κάποια χαρακτηριστικά του καρυδέλαιου.



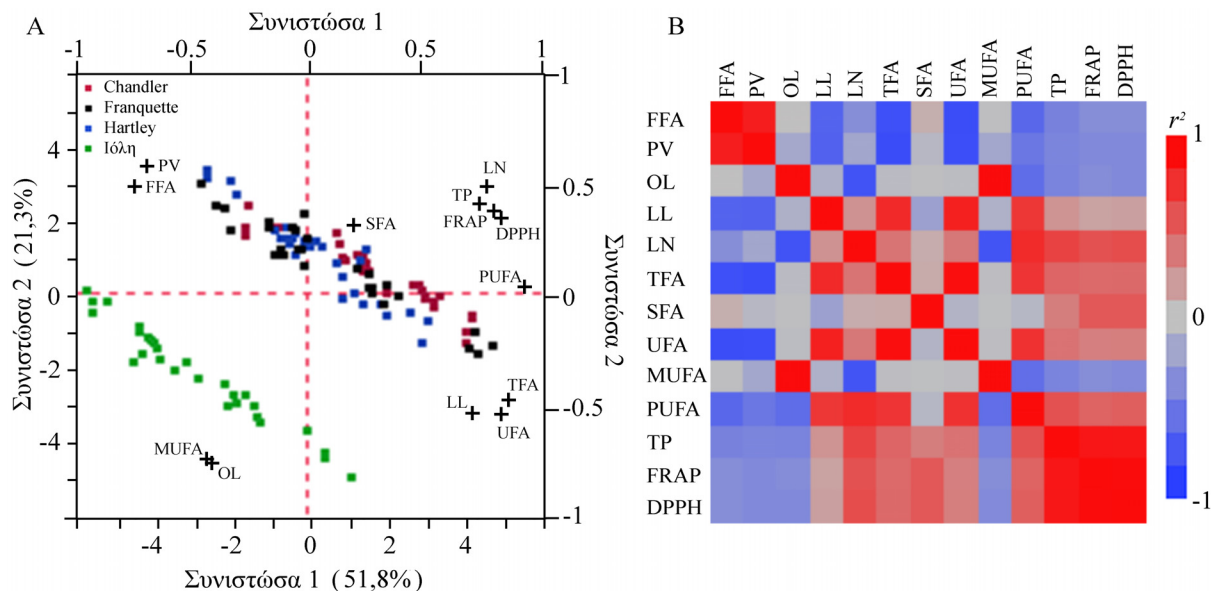
Συγκεκριμένα, φάνηκε θετική σχέση ανάμεσα στα LN και PUFA με τις τρεις αντιοξειδωτικές παραμέτρους (TP, FRAP, DPPH). Αντίθετη σχέση φάνηκε να υπάρχει ανάμεσα στα αντιοξειδωτικά με τα FFA και PV. Οι παραπάνω σχέσεις υποστηρίχθηκαν και από την ανάλυση συσχέτισης (Γράφημα 2.16B), χωρίς ωστόσο να προκύπτουν πολύ υψηλοί συντελεστές  $r^2$ . Από την εξέταση του score plot (Γράφημα 2.16A) φάνηκε μόνο η 'Ιόλη' να διαχωρίζεται από τις άλλες τρεις ποικιλίες, ωστόσο εξετάζοντας και την τρίτη συνιστώσα (Γράφημα 2.17) προέκυψε ικανοποιητικός διαχωρισμός και μεταξύ των

**Πίνακας 2. 23.** Παράμετροι ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) των αντιοξειδωτικών παραμέτρων και των κύριων παραμέτρων του καρυδέλαιου (Γράφημα 2.16A) στα αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών κατά τη συντήρηση στα Πειράματα Α και Β.

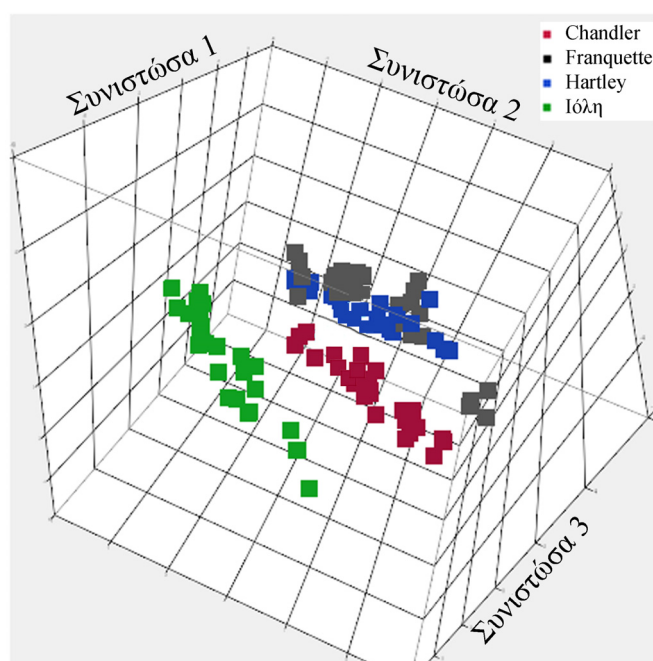
Συνιστώσα #	Eigenvalue	Εξηγούμενη διακύμανση (%)	Συνολική εξηγούμενη διακύμανση (%)
1	6,731	51,8	51,8
2	3,290	25,3	77,1
3	2,000	15,4	92,5
4	0,476	3,7	96,1
5	0,271	2,1	98,2
6	0,131	1,0	99,2
7	0,054	0,4	99,6
8	0,039	0,3	99,9
9	0,009	0,1	100,0
10	0,001	0,0	100,0
11	0,000	0,0	100,0
12	0,000	0,0	100,0
13	0,000	0,0	100,0

'Chandler', 'Franquette' και 'Hartley'. Παράλληλα η διασπορά των σημείων της κάθε ποικιλίας στο τρισδιάστατο score plot ήταν παρόμοια μεταξύ των τεσσάρων ποικιλιών.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, η μελέτη των σχέσεων μεταξύ όλων των παραμέτρων μπορεί να ερμηνευθεί με βάση τις πολυμεταβλητές αναλύσεις για κάθε ποικιλία ξεχωριστά. Οι PCA και οι συσχετίσεις για κάθε ποικιλία έδειξαν, επιπλέον στενές σχέσεις μεταξύ των αντιοξειδωτικών παραμέτρων των χαρακτηριστικών του καρυδέλαιου (Γράφημα 2.18). Συγκεκριμένα, αρνητική συσχέτιση χαρακτήρισε τα αντιοξειδωτικά (TP, FRAP, DPPH) με τα FFA και PV έχοντας συντελεστές  $r^2$  0,87-0,96 και 0,88-0,97, αντίστοιχα. Παράλληλα, ισχυρή θετική σχέση είχαν τα αντιοξειδωτικά με τα LL ( $r^2=0,46-0,85$ ), TFA ( $r^2=0,75-0,88$ ), UFA ( $r^2=0,77-0,88$ ), PUFA ( $r^2=0,67-0,88$ ), δευτερευόντως με το LN ( $r^2=0,36-0,75$ ), ενώ μικρότερη έως χαμηλή σχέση με OL ( $r^2=0,29-0,84$ ), MUFA ( $r^2=0,33-0,86$ ) και SFA ( $r^2= -0,13-0,56$ ).



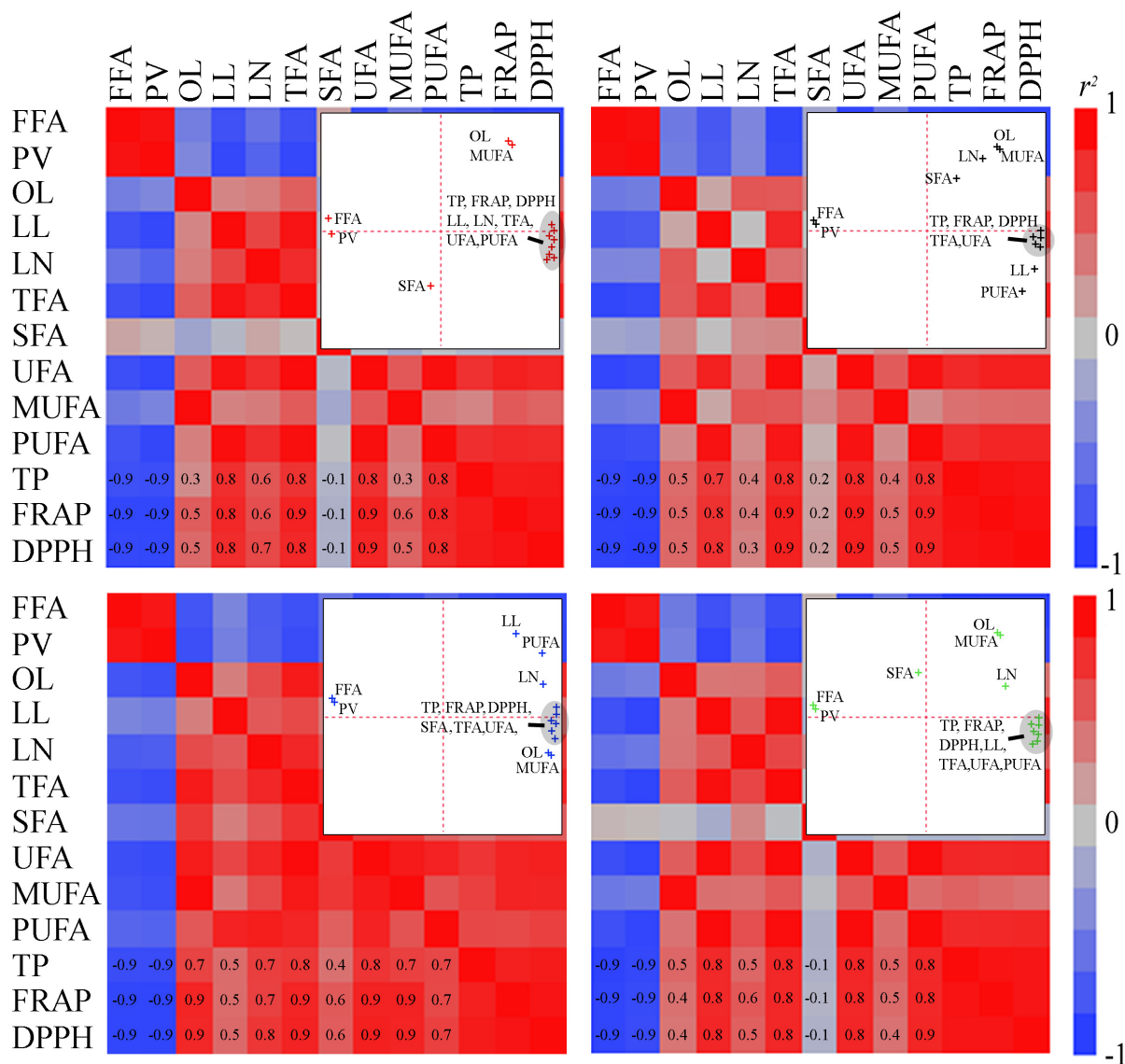
**Γράφημα 2. 16.** (Α) Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) και (Β) ανάλυση συσχέτισης των αντιοξειδωτικών παραμέτρων και των κύριων χαρακτηριστικών του καρυδέλαιου στα αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών κατά τη συντήρηση στα Πειράματα Α και Β. Μεταβλητές: ολικά φαινολικά (TP), ολική αντιοξειδωτική ικανότητα εκτιμώμενη με τις μεθόδους FRAP και DPPH, ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA), βαθμός υπεροξειδίων (PV), ολικά λιπαρά οξέα (TFA), κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA), ακόρεστα λιπαρά οξέα (UFA), μονο-ακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA), πολύ-ακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), ελαϊκό (OL), λινολεϊκό (LL), λινολενικό (LN). Στο (Α): αριστερός και κάτω άξονες αντιστοιχούν στις τιμές των κυρίων συνιστωσών (score plot); δεξιάς και επάνω άξονες αντιστοιχούν στους συντελεστές των κυρίων συνιστωσών (loading plot); Τα χρωματιστά τετράγωνα υποδεικνύουν τη θέση του κάθε δείγματος στο score plot; Οι σταυροί υποδεικνύουν τη θέση της κάθε μεταβλητής στο loading plot; Οι τιμές στις παρενθέσεις αντιστοιχούν στο ποσοστό της συνολικής διακύμανσης που εξηγείται από την κάθε συνιστώσα. Στο (Β): χάρτης των συσχετίσεων μεταξύ των μεταβλητών ανά δύο.



**Γράφημα 2. 17.** Τριδιάστατη απεικόνιση των τιμών των κυρίων συνιστωσών (score plot) από την ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) των αντιοξειδωτικών παραμέτρων και των κύριων χαρακτηριστικών του καρυδέλαιου (Πίνακας 2.23, Γράφημα 2.16) στα αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς κατά τη συντήρηση στα Πειράματα Α και Β.

## Chandler

## Franquette



## Hartley

## Ιόλη

**Γράφημα 2. 18.** Αναλύσεις κύριων συνιστωσών (PCA) και αναλύσεις συσχέτισης των αντιοξειδωτικών παραμέτρων και των κύριων χαρακτηριστικών του καρυδέλαιου ανά ποικιλία στα αποξηραμένα σπέρματα καρδιάς κατά τη συντήρηση, στα Πειράματα A και B. Μεταβλητές: ολικά φαινολικά (TP), αντιοξειδωτική ικανότητα εκτιμώμενη με τις μεθόδους FRAP και DPPH, ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA), βαθμός υπεροξειδίων (PV), ολικά λιπαρά οξέα (TFA), κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA), ακόρεστα λιπαρά οξέα (UFA), μονο-ακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA), πολύ-ακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), ελαϊκό (OL), λινολεϊκό (LL), λινολενικό (LN). Παρουσιάζεται ο χάρτης των συσχετίσεων μεταξύ των μεταβλητών ανά δύο για κάθε ποικιλία. Για κάθε ζεύγος των αντιοξειδωτικών παραμέτρων και των χαρακτηριστικών του καρυδέλαιου δίνεται ο συντελεστής συσχέτισης. Εντός του κάθε χάρτη συσχετίσεων παρατίθεται το γράφημα των συντελεστών (loading plot) από την PCA για κάθε ποικιλία.

## **2.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

---

### **2.4.1. Περιεκτικότητα υγρασίας των σπερμάτων**

Η εφαρμογή κατάλληλων διαδικασιών κατά τη συγκομιδή και τα πρώτα στάδια της μετά-συλλεκτικής ζωής των ξηρών καρπών είναι εξαιρετικά σημαντική, ώστε να διασφαλιστεί η καλύτερη δυνατή ποιότητα του προϊόντος. Η αποξήρανση των καρυδιών είναι μια κοινή πρακτική που εφαρμόζεται, με στόχο να μειωθεί η περιεκτικότητα της υγρασίας του σπέρματος εντός συγκεκριμένων ορίων (3-13 % w/w), ώστε να διασφαλιστεί η μετέπειτα σωστή συντήρησή τους (Kader and Thompson, 2002). Ο σημαντικότερος παράγοντας κατά την ξήρανση των καρυδιών είναι η θερμοκρασία του αέρα που εφαρμόζεται, της οποίας τα επιθυμητά όρια είναι από 32° C έως 43° C (Hassan-Beygi et al., 2009). Στην παρούσα μελέτη, η αποξήρανση (στους 36° C) είχε ως αποτέλεσμα μείωση της υγρασίας των σπερμάτων κάτω από το 6% (w/w), γεγονός που διασφάλισε την καλύτερη δυνατή σταθερότητα κατά τη συντήρηση. Οι μικρές αλλά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ποικιλιών που παρατηρήθηκαν, μπορούν να αποδοθούν σε διαφορές που σχετίζονται κύρια με φυσικές ιδιότητες (σχήμα, πάχος, διαπερατότητα) του κελύφους ή άλλα χαρακτηριστικά των γονοτύπων, δεδομένου ότι όλες οι συνθήκες αποξήρανσης (χρόνος, θερμοκρασία και ροή αέρα) ήταν σταθερές.

### **2.4.2. Ολικά φαινολικά (TP) και αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)**

Στα αποξηραμένα σπέρματα το εύρος της συγκέντρωσης των TP πριν τη συντήρηση στις τέσσερις ποικιλίες που εξετάστηκαν ήταν εντός των τιμών που έχουν προσδιοριστεί στα καρύδια (Arranz et al., 2008; Kornsteiner et al., 2006; Yang et al., 2009). Ωστόσο, στις εργασίες αυτές εξετάστηκαν καρποί διαφορετικών ποικιλιών ή άγνωστης προέλευσης. Σε άλευρο από καρπούς ‘Chandler’ τα TP προσδιορίστηκαν σε συγκέντρωση 16,3 mg GAE g<sup>-1</sup> (Labuckas et al., 2008), ενώ σε καρπούς της ‘Franquette’ η συγκέντρωση βρέθηκε 78,6 mg GAE g<sup>-1</sup> (Pereira et al., 2008). Στην τελευταία εργασία, τα TP μεταξύ έξι ποικιλιών καρυδιάς προσδιορίστηκαν σε επίπεδα από ~59 mg GAE g<sup>-1</sup> έως ~95 mg GAE g<sup>-1</sup> που είναι κατά 3-έως 4-φορές υψηλότερα από τις τιμές της παρούσας μελέτης, αλλά και των λοιπών τιμών που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Οι πολύ υψηλές τιμές των Pereira et al. (2008) είναι πιθανό να οφείλονται στον τρόπο εκχύλισης με απιονισμένο νερό υπό βρασμό για 45 min, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει χημικές μεταβολές των συστατικών του εκχυλίσματος και να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση των TP (Singleton et al., 1999).

Κατά τη συντήρηση, παρατηρήθηκε μια σταδιακή μείωση των TP με κοινή τάση για όλες τις ποικιλίες. Σε ορισμένες περιπτώσεις η απώλεια των καρπών σε TP ήταν μεγαλύτερη του 50% γεγονός που σημαίνει ότι κατά την συντήρηση των καρυδιών μπορεί να επέλθει πολύ υψηλή υποβάθμιση της θρεπτικής αξίας. Η χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης (1° C) και

η πλήρωση της συσκευασίας με N<sub>2</sub> ή CO<sub>2</sub> περιόρισαν προσθετικά την απώλεια σε TP. Είναι αξιοσημείωτο ότι για την κάθε ποικιλία η συντήρηση στον 1-N<sub>2</sub> ή 1-CO<sub>2</sub> παρεμπόδισε κάθε απώλεια των TP, τουλάχιστον κατά τους πρώτους 4 mo. Περιορισμός στις απώλειες των TP από τη χαμηλή θερμοκρασία και το χαμηλό O<sub>2</sub> έχει παρατηρηθεί και κατά τη συντήρηση καρπών φιστικιάς (Tsantili et al., 2011). Παρόμοια θετική επίδραση της χαμηλότερης θερμοκρασίας, ακόμα και σε υψηλότερο εύρος θερμοκρασιών (20-35° C), έχει αναφερθεί στην αραχίδα (Talcott et al., 2005).

Οι απώλειες σε TP μπορούν να αποδοθούν στην χημική ή/και ενζυμική οξείδωση των φαινολικών συστατικών κατά τη συντήρηση (Manzocco et al., 2001). Επομένως, ο περιορισμός των απωλειών, στις διάφορες συνθήκες που εξετάστηκαν, αποδίδεται στον περιορισμό των οξειδωτικών αντιδράσεων από τη χαμηλή θερμοκρασία ή/και το χαμηλό O<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα συντήρησης. Ωστόσο, το υλικό συσκευασίας που χρησιμοποιήθηκε δεν ήταν απολύτως αποτελεσματικό, ώστε να παρεμποδίσει πλήρως την είσοδο του O<sub>2</sub> εντός της συσκευασίας. Επίσης, στους 20° C τα επίπεδα του O<sub>2</sub> ήταν περίπου κατά 2-φορές υψηλότερα σε σχέση με τον 1° C, γεγονός που οφείλεται στην αυξημένη περατότητα του υλικού συσκευασίας με την άνοδο της θερμοκρασίας (Gomes et al., 2010). Επομένως, οι μεγαλύτερες απώλειες TP που παρατηρήθηκαν στους 20° C θα πρέπει να αποδοθούν όχι μόνο στην άμεση επίδραση της θερμοκρασίας επί της προώθησης της οξείδωσης των φαινολικών (Manzocco et al., 2001), αλλά και στην έμμεση, μέσω της αύξησης της συγκέντρωσης του O<sub>2</sub> εντός της συσκευασίας. Τα παρόμοια επίπεδα O<sub>2</sub>, σε όλους τους χρόνους συντήρησης, στις συσκευασίες που πληρώθηκαν είτε με N<sub>2</sub> ή με CO<sub>2</sub>, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η διείσδυση του O<sub>2</sub> εξαρτάται κυρίως από τις αλλαγές στις φυσικές ιδιότητες του υλικού που μπορεί να προκαλέσει η θερμοκρασία, παρά σε άλλους παράγοντες. Στο γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθούν τα παρόμοια επίπεδα TP στις συσκευασίες υπό N<sub>2</sub> και CO<sub>2</sub>.

Για όλες τις ποικιλίες, οι μεταβολές των TP κατά τη συντήρηση παρουσίασαν μια κοινή τάση, ωστόσο παρατηρήθηκαν διαφορές, αν και μικρές, μεταξύ τους όσον αφορά την ποσοστιαία απώλεια τους. Οι διαφορές αυτές πιθανόν να οφείλονται τόσο στο αρχικό προφίλ των φαινολικών της κάθε ποικιλίας, όσο και σε άλλα χαρακτηριστικά που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των φαινολικών. Πράγματι έχει βρεθεί ότι στο σπέρμα των καρυδιών η ποσοστιαία αναλογία των διαφόρων φαινολικών μορίων διαφέρει (Colaric et al., 2005). Επίσης, έχουν βρεθεί διαφορές στις ποσοστιαίες μεταβολές κατά τη συντήρηση μεταξύ των διαφορετικών φαινολικών ενώσεων στα καρύδια (Christopoulos et al., 2010), και στην αραχίδα (Talcott et al., 2005), γεγονός που υποδηλώνει διαφορετική ανταπόκριση της κάθε ένωσης στις συνθήκες συντήρησης. Πράγματι, ο βαθμός οξείδωσης μιας φαινολικής ένωσης εξαρτάται από τον αριθμό και τη θέση των υδροξυλομάδων του φαινολικού δακτυλίου (Yokoyama et al., 1998).

Οι τέσσερις ποικιλίες που εξετάστηκαν παρουσίασαν πολύ υψηλές τιμές TAC και με τις δύο μεθόδους εκτίμησης που χρησιμοποιήθηκαν (FRAP και DPPH). Οι τιμές της TAC, εκφραζόμενες σε  $\mu\text{mol TAE g}^{-1}$ , ήταν εντός του εύρους των τιμών που έχουν βρεθεί με τις μεθόδους FRAP (Blomhoff et al., 2006; Halvorsen et al., 2002), DPPH (Abe et al., 2010), αλλά και τις ABTS και ORAC (Arranz et al., 2008). Εφαρμόστηκαν δύο μέθοδοι εκτίμησης της TAC, καθώς στη βιβλιογραφία προτείνεται η χρήση περισσότερων της μιας μεθόδων δεδομένου ότι η κάθε μέθοδος εκτιμά και κάποια διαφορετική αντιοξειδωτική ιδιότητα (Apak et al., 2007; Huang et al., 2007; Prior et al., 2005). Συγκεκριμένα, η FRAP εκτιμά την αναγωγική ικανότητα (reducing activity), ενώ η DPPH εκτιμά την ικανότητα εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών (antiradical activity) (Benzie and Strain, 1996; Brand-Williams et al., 1995; Huang et al., 2005). Στο γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί και η μικρή υπεροχή των τιμών της TAC που ανακτήθηκαν με την FRAP σε σχέση με την DPPH. Αντίστοιχες διαφοροποιήσεις έχουν παρατηρηθεί κατά την εκτίμηση της TAC σε άλλους ξηρούς καρπούς και φρούτα (Gil et al., 2002; Tsantili et al., 2011). Ωστόσο, πολύ υψηλή συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ των τιμών της FRAP και της DPPH, η οποία επιβεβαιώθηκε και από την PCA, προφανώς επειδή και οι δύο μέθοδοι βασίζονται στην ίδια αρχή (Μεταφορά μονήρους ηλεκτρονίου, Single Electron Transfer, SET-methods) (Apak et al., 2007; Prior et al., 2005).

Η τάση αλλαγών των τιμών της TAC παρουσίασε ομοιότητα με αυτή των TP η οποία οφείλεται στη μεγάλη συνεισφορά των φαινολικών στην αντιοξειδωτική ικανότητα των καρυδιών (Cerda et al., 2004; Fukuda et al., 2003; Li et al., 2006). Επίσης, αναφέρεται ότι η οξείδωση των φαινολικών ενώσεων είναι υπεύθυνη για την απώλεια της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός προϊόντος (Manzocco et al., 2001). Στην παρούσα μελέτη, η ισχυρή σχέση μεταξύ TP και TAC επιβεβαιώθηκε τόσο μέσω της ανάλυσης συσχέτισης όσο και την PCA. Συσχέτιση μεταξύ TP και TAC έχει επίσης βρεθεί και σε άλλες εργασίες σε ολόκληρα σπέρματα καρυδιών (Li et al., 2006; Pereira et al., 2008), αλλά και σε κλάσματα μέρους του σπέρματος (Salcedo et al., 2010).

Πέρα από τη γενική σχέση μεταξύ των επιπέδων TP και TAC που παρατηρήθηκε, υπήρξαν και κάποιες διαφοροποιήσεις μεταξύ τους. Σε κάθε δειγματοληψία και στις ίδιες συνθήκες συντήρησης η 'Hartley' παρουσίασε υψηλότερες τιμές TAC σε σχέση με την 'Chandler', παρόλο που η τελευταία ποικιλία είχε υψηλότερη συγκέντρωση TP. Η ανακολουθία αυτή πιθανόν να οφείλεται σε διαφορές της σύστασης μεταξύ των δυο αυτών ποικιλιών είτε όσον αφορά μη φαινολικά συστατικά που συνεισφέρουν στην TAC, όπως οι τοκοφερόλες (Li et al., 2007), είτε σε διαφορές των φαινολικών προφίλ τους, καθώς η κάθε φαινολική ένωση συνεισφέρει διαφορετικά στην TAC (Zhang et al., 2009). Παράλληλα αναφέρεται ότι η κάθε μέθοδος εκτίμησης της TAC δεν μετρά ακριβώς τις ίδιες ιδιότητες των φαινολικών (Blomhoff et al., 2006).

Οι ποσοστιαίες απώλειες της TAC ήταν ελαφρώς μικρότερες σε σχέση με αυτές των TP, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί σε ποσοτικές διαφοροποιήσεις μεταξύ ενώσεων του φαινολικού προφίλ που συμβαίνουν κατά τη συντήρηση και έχουν παρατηρηθεί τόσο στα καρύδια (Christopoulos et al., 2010), όσο και στην αραχίδα (Talcott et al., 2005). Δεδομένου ότι η TAC εξαρτάται από την ποσότητα και τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της κάθε φαινολικής ένωσης (Rice-Evans et al., 1996), είναι λογικές οι μικρές διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν στις μεταβολές μεταξύ TAC και TP. Επίσης, σε ορισμένες περιπτώσεις οι μερικώς οξειδωμένες φαινολικές ενώσεις ενδέχεται να παρουσιάζουν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τις μη οξειδωμένες (Manzocco et al., 2001). Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν ότι οι φαινολικά μόρια, ακόμα και αν σχηματίζονται κατά τη διάρκεια οξειδωτικών αντιδράσεων, μπορούν να λάβουν μέρος στην αντίδραση Μαιγιάρντ (Maillard reaction), οδηγώντας στο σχηματισμό διαφόρων ενώσεων με ιδιαίτερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν περιορισμένα στοιχεία όσον αφορά τα TP και την TAC συγκεκριμένων ποικιλιών καρυδιάς, ενώ δεν υπάρχουν στοιχεία για τις μεταβολές των παραπάνω χαρακτηριστικών κατά τη συντήρηση των σπερμάτων. Στην καλλιέργεια της καρυδιάς παγκοσμίως η επιλογή των ποικιλιών στηρίζεται κυρίως σε κριτήρια ποσοτικά (παραγωγικότητα, ταχύτητα εισόδου σε καρποφορία), ή/και ποιοτικά με βάση την αντίληψη του καταναλωτή (μέγεθος, σχήμα και χρώμα σπέρματος) (Hendries et al., 1998). Ωστόσο, οι διαφορές μεταξύ των ποικιλιών, όσον αφορά τα επίπεδα των TP και της TAC, σε συνδιασμό με τις μεταβολές τους κατά τη συντήρηση που παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν σημαντικές και θα πρέπει να συνυπολογίζονται κατά την επιλογή της ποικιλίας. Συγκεκριμένα, οι 'Chandler', 'Franquette' και 'Hartley' ακόμα και μετά από συντήρηση 12 μο στις πιο ανεπιθύμητες συνθήκες (20-air) είχαν υψηλότερα επίπεδα TP και TAC από την 'Ιόλη' πριν τη συντήρηση. Ωστόσο, τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών της 'Ιόλη' είναι πολύ υψηλά αν συγκριθούν με τα περισσότερα είδη ξηρών καρπών αλλά και άλλων φυτικών προϊόντων (Halvorsen et al., 2002; Halvorsen et al., 2006; Kornsteiner et al., 2006).

### **2.4.3. Χρώμα σπέρματος**

Το χρώμα του σπέρματος του καρυδιού αποτελεί χαρακτηριστικό ποιότητας με βάση την αντίληψη του καταναλωτή (Kader and Thompson 2002; Koyuncu et al., 2003; Mexis et al., 2009) και ταξινομείται από εξαιρετικά ανοιχτόχρωμο-φωτεινό (extra light) έως καφέ-κεχριμπαρένιο (amber) (IPGRI, 1994). Υπάρχουν περιορισμένα στοιχεία στη βιβλιογραφία σχετικά με το χρώμα των καρυδιών εκτιμώμενο με αντικειμενική μέθοδο. Σε μελέτες με καρύδια άγνωστης ποικιλίας αναφέρονται τιμές του  $L^*$  ~46 (Wang et al., 2007), και ~40 (Crowe and White, 2003). Στην παρούσα μελέτη, για όλες τις ποικιλίες, το  $h^o$  ήταν κοντά

στην τιμή 80 που χαρακτηρίζει έναν ανοιχτό κίτρινο χρωματισμό (McGuire, 1992) και το  $L^*$  ήταν υψηλότερο από την τιμή 40 η οποία διασφαλίζει καλή ποιότητα σύμφωνα με τα πρότυπα της βιομηχανίας καρυδιών (Wang et al., 2007). Σύμφωνα με τους Warmund et al. (2009), ένα άθροισμα των τιμών των  $L^*$ ,  $h^o$  και  $C^*$  μεγαλύτερο της τιμής 155 αντιστοιχεί σε ανοιχτόχρωμα σπέρματα (light kernels) καλής ποιότητας. Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν τιμή 166 του αθροίσματος αυτού για την ‘Chandler’ που θεωρείται ως η πιο ανοιχτόχρωμη ποικιλία που καλλιεργείται στην Καλιφόρνια.

Μεταξύ των εξεταζόμενων ποικιλιών η ‘Ιόλη’ μπορεί να θεωρηθεί ως η πιο ανοιχτόχρωμη μιας και παρουσίασε τη μεγαλύτερη τιμή στο  $h^o$ , ακολουθούμενη από την ‘Chandler’, ενώ ‘Hartley’ και ‘Franquette’ εμφάνισαν πιο σκούρο χρωματισμό χωρίς ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ τους. Το χρώμα του καρυδιού μπορεί να επηρεαστεί από από τις συνθήκες καλλιέργειας ή/και τους μετά-συλλεκτικούς χειρισμούς (συγκομιδή, αποφλοιώση, αποξήρανση) (Koyuncu et al., 2003; Warmund et al., 2009). Οι παρατηρούμενες διαφορές του χρώματος μεταξύ των τεσσάρων ποικιλιών πιθανόν να οφείλονται στην διαφορετική ανταπόκριση της κάθε μιας στις συνθήκες αποξήρανσης ή/και σε χαρακτηριστικά που σχετίζονται με το χρώμα, δεδομένου ότι όλες οι ποικιλίες καλλιεργήθηκαν υπό τις ίδιες εδαφοκλιματικές συνθήκες. Σύμφωνα με τους Crowe and White (2003), το χρώμα του σπέρματος μπορεί να επηρεάζεται από την περιεκτικότητα σε καρυδέλαιο, καθώς βρήκαν υψηλότερες τιμές του  $L^*$  και πιο ανοιχτόχρωμα σπέρματα σε καρπούς μειωμένου λίπους. Πράγματι, στην παρούσα μελέτη οι σκουρόχρωμες ποικιλίες (Hartley, Franquette) είχαν υψηλότερη ελαιοπεριεκτικότητα από τις ανοιχτόχρωμες (Ιόλη, Chandler) γεγονός που ενισχύει τον παραπάνω ισχυρισμό.

Κατά τη συντήρηση, οι μειωμένες τιμές των παραμέτρων  $L^*$ ,  $h^o$  και WI υποδεικνύουν την τάση των σπερμάτων να καφετιάζουν και επομένως να υποβαθμίζεται η ποιότητά τους. Το καφέτιασμα των καρυδιών κατά τη συντήρηση έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες εργασίες (Koyuncu et al., 2003; Lopez et al., 1995), αλλά σε αυτές η εκτίμηση έγινε με οπτική παρατήρηση. Το καφέτιασμα ενός προϊόντος αποδίδεται κυρίως στην ενζυμική ή χημική οξείδωση των φαινολικών ενώσεων η οποία οδηγεί στο σχηματισμό σκουρόχρωμων ενώσεων (Manzocco et al., 2001). Στην παρούσα μελέτη το πιο έντονο καφέτιασμα (χαμηλότερες τιμές  $L^*$ ,  $h^o$  και WI) παρατηρήθηκε κατά τη συντήρηση στους 20-air όπου βρέθηκε και η μεγαλύτερη απώλεια TP. Η σχέση μεταξύ καφετιάσματος και φαινολικών επιβεβαιώθηκε από την ανάλυση συσχέτισης και την PCA. Επομένως στην παρούσα μελέτη, ο περιορισμός του καφετιάσματος, προσθετικά από τη χαμηλή θερμοκρασία και το χαμηλό  $O_2$  στην ατμόσφαιρα συντήρησης, προήλθε από τον περιορισμό της οξείδωσης των φαινολικών υπό αυτές τις συνθήκες. Μάλιστα, είναι αξιοσημείωτο ότι τα καρύδια συντηρούμενα στον 1- $N_2$  ή 1- $CO_2$  δεν καφέτιασαν ακόμα και μετά από 12 mo. Ο περιορισμός



του καφετιάσματος με την επίδραση ίδιων παραγόντων έχει επίσης παρατηρηθεί κατά τη συντήρηση των κουκιών (Nasar-Abbas et al., 2008) και της πάστας φιστικιών (Gamli and Hayoglu, 2007).

Στην παρούσα μελέτη σε καμιά περίπτωση (ακόμα και στις λιγότερο ευνοϊκές συνθήκες συντήρησης) οι τιμές του  $L^*$  δεν έπεσαν κάτω από την τιμή 40 που θεωρείται όριο για την βιομηχανία. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στις υψηλές τιμές που είχαν τα σπέρματα πριν τη συντήρηση λόγω των χειρισμών από τη συγκομιδή μέχρι τη συσκευασία. Πράγματι, η συγκομιδή, αποφλοιώση, αποξήρανση (υπό ήπιες συνθήκες) και η συσκευασία των καρπών έγινε σε διάστημα 48 h, υποδεικνύοντας την μεγάλη προαπαιτούμενη σημασία των χειρισμών αυτών ώστε να εξασφαλισθεί η καλή συντήρηση των καρυδιών.

#### **2.4.4. Ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) και βαθμός υπεροξειδίων (PV)**

Πριν τη συντήρηση, για όλες τις ποικιλίες οι τιμές των FFA και PV ήταν εξαιρετικά χαμηλές ( $< 0,025\%$  και  $< 0,035 \text{ meq O}_2 \text{ kg}^{-1}$ , αντίστοιχα). Στην βιβλιογραφία υπάρχουν πολλά δεδομένα όσον αφορά τα FFA και PV του καρυδέλαιου, ωστόσο, οι τιμές τους παρουσιάζουν εξαιρετικά μεγάλο εύρος (FFA = 0,01-0,7%, PV = 0,05-3,5 meq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>) (Al-Bachir, 2004; Bakkalbaşı et al., 2012; Crowe and White, 2003; Gan et al., 2005; Jensen et al., 2003; Jensen et al., 2001; Johnson et al., 1998; Koyuncu et al., 2003; López et al., 1995; Martínez et al., 2010; Martínez and Maestri, 2008; Mate et al., 1996; Mexis et al., 2009; Mitcham et al., 2004; Özcan et al., 2010; Savage et al., 2001; Vanhanen and Savage, 2006; Wang et al., 2001; Wang et al., 2006; Wang et al., 2007; Wilson-Kakashita et al., 1995). Οι περισσότερες από τις παραπάνω έρευνες αναφέρονται σε καρυδέλαιο διαφορετικών ή/και αγνώστων ποικιλιών, που μεταχειρίστηκαν κάτω από διαφορετικές ή/και άγνωστες συνθήκες (αποφλοιώση, αποξήρανση, χρόνος δειγματοληψίας, μέθοδος εξαγωγής καρυδέλαιου). Στην παρούσα εργασία, οι αρχικές τιμές τόσο των FFA όσο και του PV ήταν κοντά στο κατώτατο όριο της βιβλιογραφίας, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στις ήπιες συνθήκες αποξήρανσης (36° C για 24 h), στον μικρό χρόνο που μεσολάβησε ( $< 48 \text{ h}$ ) από τη συγκομιδή μέχρι την πρώτη δειγματοληψία και στην ψυχρή έκθλιψη. Οι αρχικές τιμές για τις ποικιλίες Chandler, Franquette και Hartley είναι σε συμφωνία με τις τιμές FFA (0,05-0,07%) και PV (0,05-0,08 meq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>) που έχουν βρεθεί για τις ποικιλίες αυτές μετά από αποξήρανση στους 30° C για 24 h (Martínez and Maestri, 2008), ενώ δεν υπάρχουν στοιχεία στην βιβλιογραφία για την 'Ιόλη'.

Η υγρασία, η θερμοκρασία, το φως, το O<sub>2</sub> και οι μικροοργανισμοί αποτελούν εξωγενείς παράγοντες που επηρεάζουν τα FFA και το PV, ενώ ενδογενείς είναι τα ένζυμα, τα μέταλλα, οι φυτοχημικές ενώσεις (όπως φαινολικά), το πλήθος των διπλών δεσμών (ακορεστότητα) του FA και η περιεκτικότητα σε καρυδέλαιο (Crowe and White, 2003;

Frankel, 1991; Hamilton et al., 1997; Maskan and Karatas, 1998; Robards et al., 1988; Robinson et al., 1995; Salcedo et al., 2010; Zacheo et al., 1998; Zacheo et al., 2000).

Κατά τη συντήρηση των καρυδιών έχει παρατηρηθεί αύξηση τόσο των FFA (López et al., 1995; Mitcham et al., 2004; Wang et al., 2001; Wang et al., 2006; Wang et al., 2007), όσο και του PV (Jensen et al., 2001; Maté et al., 1996; Mexis et al., 2009). Πράγματι και στην παρούσα εργασία τα επίπεδα των FFA και του PV αυξήθηκαν μετά από 12 mo σε όλες τις συνθήκες. Οι αυξήσεις αυτές υποδεικνύουν την ποιοτική υποβάθμιση δεδομένου ότι, σύμφωνα με την γευστική αντίληψη του καταναλωτή, τα FFA και PV αντιπροσωπεύουν το τάγγισμα (υδρολυτικό και οξειδωτικό, αντίστοιχα) (Robards et al., 1988). Το υδρολυτικό τάγγισμα προκαλείται με την αποδέσμευση FA μέσω υδροθερμικής (hydrothermal) ή/και ενζυμικής (με δράση της λιπάσης) υδρόλυσης των τριακυλγλυκερολών (Robards et al., 1988; Wang et al., 2001). Στα καρύδια έχει βρεθεί ότι η λιπάση παραμένει ενεργή ακόμα και μετά την αποξήρανση (Greve and Labavitch, 1985) και επομένως το ένζυμο αυτό πιθανόν να ήταν υπεύθυνο για την άνοδο των FFA που παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία. Όσον αφορά το οξειδωτικό τάγγισμα, αυτό προκαλείται από την οξείδωση των FA, οδηγώντας στον σχηματισμό, σε πρώτο στάδιο, υπεροξειδίων που εκτιμώνται ποσοτικά με το PV (Frankel, 1991; Mexis et al., 2009; Paradiso et al., 2010; Robards et al., 1988; St. Angelo et al., 1996). Οι μηχανισμοί της οξείδωσης αυτής είναι η αυτό-οξείδωση, η φωτό-οξείδωση και η ενζυμική οξείδωση (με τη δράση του ενζύμου λιποξειγενάση) (Frankel, 1991; Paradiso et al., 2010; Robards et al., 1988; Robinson et al., 1995; Salcedo et al., 2010). Η άνοδος του PV κατά τη συντήρηση στην παρούσα εργασία μπορεί να αποδοθεί στους παραπάνω μηχανισμούς, εξαιρούμενου αυτού της φωτό-οξείδωσης εφόσον όλη η συντήρηση έγινε σε έλειψη φωτός.

Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι τα επίπεδα των FFA και του PV περιορίστηκαν από τη χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης ή/και την συσκευασία υπό N<sub>2</sub> και CO<sub>2</sub> (μειωμένο O<sub>2</sub>), με τους δυο αυτούς παράγοντες να δρουν προσθετικά. Οι μεταβολές των FFA κατά τη συντήρηση των καρυδιών έχει μελετηθεί σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (3°-35° C), όπου έχει παρατηρηθεί ότι σε χαμηλότερη θερμοκρασία τα επίπεδα των FFA είναι μειωμένα (López et al., 1995; Mitcham et al., 2004; Wang et al., 2001; Wang et al., 2006; Wang et al., 2007). Επίσης, στην ποικιλία Hartley έχουν βρεθεί, σε επιταχυνόμενες συνθήκες συντήρησης (37° C, για 2 εβδομάδες), επίπεδα FFA υπό αέρα κατά ~2-φορές υψηλότερα σε σχέση με την έκθεση υπό N<sub>2</sub> (Greve and Labavitch, 1985). Οι μεταβολές του PV κατά τη συντήρηση των καρυδιών έχει μελετηθεί εκτενώς σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (5°-40° C) και περιεκτικότητες O<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα συντήρησης (2,5-50%). Όπως και στην περίπτωση των FFA, τα επίπεδα του PV έχουν βρεθεί να περιορίζονται στην χαμηλότερη θερμοκρασία (Crowe and White, 2003; Jensen et al., 2001; Mexis et al., 2009; Mitcham et al., 2004; Vanhanen and Savage, 2006) και το χαμηλό O<sub>2</sub> (Jensen et al., 2003; Maté et al., 1996), με την

επίδραση των δύο αυτών παραγόντων να είναι συνδυαστική (Bakkalbaşı et al., 2012; Mexis et al., 2009).

Η αύξηση του PV κατά τη συντήρηση, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, προκαλείται μέσω της οξείδωσης των FA και ιδιαιτέρως των UFA. Πράγματι στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε μείωση των ολικών FA του καρυδέλαιου που προήλθε από μείωση των UFA. Στατιστικά, οι PCAs και οι αναλύσεις συσχέτισης επιβεβαίωσαν τη σχέση μεταξύ των μεταβολών των UFA και του PV, δείχνοντας αντίθετη μεταβολή της μιας παραμέτρου σε σύγκριση με την άλλη. Ανάμεσα σε όλα τα UFA, το LL είχε τη στενότερη σχέση με το PV, η οποία πιθανότατα να οφείλεται στο συνδυασμό της υψηλής περιεκτικότητάς του στο καρυδέλαιο και τον υψηλό βαθμό ακορεστότητάς του (n=2) (Frankel, 1991; Hamilton et al., 1997; Maskan and Karatas, 1998; Robards et al., 1988; Robinson et al., 1995).

Παρά την κοινή τάση αύξησης μεταξύ FFA και PV, παρατηρήθηκε δραματικότερη αύξηση του PV (κατά ~200-φορες μετά από 12 mo) σε σχέση με την αύξηση των FFA (κατά ~3-φορές μετά από 12 mo). Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί, τουλάχιστον μερικώς, στην καταλυτική δράση των FFA στον σχηματισμό υπεροξειδίων, οδηγώντας σε ταχύτερο ρυθμό αύξησης του PV σε σχέση με τα FFA (Buranasompob et al., 2007; Miyashita and Takagi, 1986). Επίσης, το αέριο της συσκευασίας είχε μεγαλύτερη επίδραση επί του PV έναντι των FFA, καθώς το O<sub>2</sub> θεωρείται από τους σημαντικότερους παράγοντες που προωθούν την οξείδωση των FA και το σχηματισμό υπεροξειδίων (Frankel, 1991; Hamilton et al., 1997; Maskan and Karatas, 1998; Robards et al., 1988; Robinson et al., 1995). Στον παραπάνω λόγο μπορεί να αποδοθούν οι παρόμοιες επιδράσεις των συσκευασιών υπό N<sub>2</sub> και CO<sub>2</sub> επί των FFA και PV, δεδομένου ότι και για τα δύο αυτά είδη συσκευασίας η πορεία της συγκέντρωσης του O<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα εντός της συσκευασίας ήταν παρόμοια καθ' όλη τη συντήρηση.

Οι αντιοξειδωτικές παράμετροι των καρυδιών φάνηκε να συνδέονται με το οξειδωτικό τάγγισμα, καθώς βρέθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ PV και TP, FRAP και DPPH. Επομένως, μπορεί να υποστηριχθεί ότι τα ενδογενή αντιοξειδωτικά δρουν προστατευτικά επί των FA εμποδίζοντας την οξείδωσή τους. Σχετικά με αυτή την προστασία τα δεδομένα στη βιβλιογραφία είναι αντικρουόμενα. Έχει βρεθεί ότι τα φαινολικά έχουν παρεμποδιστική δράση επί της οξείδωσης του LL στα καρύδια (Salcedo et al., 2010), όπως επίσης βρέθηκε και σημαντική θετική συσχέτιση, αλλά με χαμηλό συντελεστή  $r^2$ , μεταξύ TAC και οξειδωτικής σταθερότητας στους καρπούς μακαντάμιας (Wall et al., 2010). Αντίθετα σε άλλη μελέτη, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ PV και αντιοξειδωτικών σε καρπούς μακαντάμιας, φουντουκιάς, αμυγδαλιάς, αραχίδιας και καρυδιάς (Maguire et al., 2004). Οι διαφοροποιήσεις αυτές μεταξύ των ερευνών είναι πιθανόν να οφείλονται τόσο στο φυτικό

είδος που μελετήθηκε, όσο και στην παραλλακτικότητα παραγόντων (κυρίως ενδογενών) του καρπού.

Οι μικρές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ποικιλιών όσον αφορά τα χαρακτηριστικά (FFA, PV) του καρυδέλαιου τους μπορούν να αποδοθούν σε ενδογενείς παράγοντες (ελαιοπεριεκτικότητα, αντιοξειδωτικά, προφίλ λιπαρών οξέων, ενεργότητα ενζύμων λιπάσης και λιποξειγενάσης). Η ποικιλία Chandler έδειξε καλύτερη σταθερότητα του καρυδέλαιου κατά τη συντήρηση που θα μπορούσε να αποδοθεί στην χαμηλή ελαιοπεριεκτικότητά της (Crowe and White, 2003). Ωστόσο, το καρυδέλαιο της 'Chandler' είχε υψηλό ποσοστό PUFA τα οποία είναι τα πιο ευπαθή FA στην οξείδωση (Frankel, 1991). Η 'Ιόλη' είχε μικρή ελαιοπεριεκτικότητα και χαμηλότερο ποσοστό PUFA από την 'Chandler', ωστόσο είχε υψηλότερο PV γεγονός που πιθανόν να σχετίζονται με τα χαμηλά επίπεδα TP και TAC που βρέθηκαν στην 'Ιόλη'. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι οι μεταβολές των χαρακτηριστικών του καρυδέλαιου κατά τη συντήρηση καθορίζονται από πολύπλοκα φαινόμενα τα οποία ελέγχονται από πολλούς παράγοντες όπου μπορεί να δρουν παράλληλα ή/και συνεργηστικά.

#### **2.4.5. Λιπαρά οξέα**

Μετά την αποξήρανση των καρυδιών η περιεκτικότητα του καρυδέλαιου σε κοινά FA ήταν ~ 97-98 % (w/w) και συμφωνεί με την περιεκτικότητα που βρέθηκε από τους Hanoussa et al. (2008). Οι ίδιοι ερευνητές προσδιόρισαν ότι ένα ποσοστό ~ 2,5 % (w/w) στο καρυδέλαιο αποτελείται από κυκλοπρόπυλ-, δίοικ-, κέτο-, οξυγονούχα και άλλα FA. Στο καρυδέλαιο όλων των ποικιλιών η περιεκτικότητα σε UFA ήταν υψηλότερη από το 80 %, ενώ τα SFA δεν ξεπέρασαν το 12 %. Τα PUFA ήταν το κύριο κλάσμα FA αποτελούμενα κυρίως από LL και δευτερευόντως από LN. Το OL ήταν το κύριο MUFA, ενώ το PA και το ST τα κύρια SFA. Η παραπάνω σύσταση του καρυδέλαιου είναι σε συμφωνία με τη σύσταση που έχει βρεθεί και σε άλλες έρευνες (Amaral et al., 2003; Dogan and Akgul, 2005; Gan et al., 2005; Kris-Etherton et al., 2000; Li et al., 2007; López et al., 1995; Pereira et al., 2008). Για τις ποικιλίες Chandler, Franquette και Hartley το προφίλ των FA ήταν εντός του εύρους που δίνεται από τους Martinez et al. (2010), ενώ για την 'Ιόλη' δεν υπάρχουν στοιχεία στη βιβλιογραφία. Για όλες τις ποικιλίες, η υψηλή περιεκτικότητα σε PUFA,  $\omega$ -3 και  $\omega$ -6 FA προσδίδει πολύ υψηλή διατητική αξία. Παράλληλα, η υψηλή διατητική αξία επιβεβαιώθηκε και από τους λόγους  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 και UFA/SFA των οποίων οι τιμές ήταν για τον μεν  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 εντός του βέλτιστου εύρους (0,2-0,4) (Gogus and Smith, 2010; Simopoulos, 2008), ενώ για το βαθμό ακορεστότητας (UFA/SFA) οι τιμές κυμάνθηκαν ψιλότερα από έλαια άλλων φυτικών ειδών (ελιά, σόγια, ηλίανθος) (Cucu et al., 2011).

Η συντήρηση των σπερμάτων προκάλεσε απώλεια FA από το καρυδέλαιο η οποία καταγράφηκε με μειωμένες τιμές TFA που έφτασαν τα επίπεδα του 11% στις λιγότερο

ευνοϊκές συνθήκες συντήρησης (20-air). Οι μειώσεις των TFA προήλθαν από μειώσεις των UFA (MUFA και PUFA) καθώς τα SFA δεν μεταβλήθηκαν κατά τη συντήρηση. Η μείωση των UFA στο καρυδέλαιο μπορεί να προέλθει μέσω της οξειδωσής τους ή/και τον μετασχηματισμό τους (πολυμερισμός, ισομερίωση, κυκλοποίηση), όπως έχει αναφερθεί γενικά για τα FA, αλλά και για το καρυδέλαιο (Frankel, 1991; Hanusa et al., 2008; Salcedo et al., 2010). Πράγματι, οι Greve and Labavitch (1985) σημείωσαν ότι άλλα συστατικά πιθανόν να συσσωρεύονται στο καρυδέλαιο, καθώς παρατήρησαν μείωση των κοινών TFA κατά 1-11% ανάλογα με την ποικιλία και τις συνθήκες μετά από συντήρηση 3 εβδομάδων στους 35° C. Επίσης προοδευτική μείωση των κοινών TFA με παράλληλη αύξηση των οξυγονωμένων και κυκλοπροπυλιωμένων FA βρέθηκε σε ομογενοποιημένα σπέρματα καρυδιών μετά από 100 d σε συνθήκες δωματίου (Hanusa et al., 2008). Στις παραπάνω έρευνες η μείωση των TFA προήλθε από τη μείωση των UFA, η οποία παρατηρήθηκε και εδώ με τις περιεκτικότητες των κύριων UFA (OL, LL, LN) να μειώνονται κατά τη συντήρηση. Αντίστοιχες μεταβολές του προφίλ των FA έχει παρατηρηθεί και σε άλλα είδη, όπως την φιστικιά (Maskan and Karatas, 1998).

Στην παρούσα μελέτη οι μειώσεις των UFA (συνολικά αλλά και των μεμονωμένων OL, LL, LN) κατά τη συντήρηση περιορίστηκαν από την χαμηλή θερμοκρασία (1° C) και τη συσκευασία υπό N<sub>2</sub> ή CO<sub>2</sub> (μειωμένο O<sub>2</sub>), με τους δυο παράγοντες να δρουν συνεργηστικά. Ανάλογοι τύπου επιδράσεις της χαμηλής θερμοκρασίας και O<sub>2</sub> έχει αναφερθεί επί της σχετικής μείωσης του LL και LN κατά τη συντήρηση φιστικιών (Maskan and Karatas, 1998). Επίσης κατά τη συντήρηση των καρυδιών σε χαμηλή θερμοκρασία και O<sub>2</sub> έχει βρεθεί περιορισμός των πτητικών συστατικών εξανάλης και μαλονδιαλδεϋδης (Mexis et al., 2009). Η εξανάλη αποτελεί δευτερογενές προϊόν της οξειδωσής του LL ενώ η μαλονδιαλδεϋδη δευτερογενές προϊόν της οξειδωσής του LN (Frankel, 1991; Hamilton et al., 1997; Robards et al., 1988).

Τα στοιχεία στη βιβλιογραφία που αφορούν την επίδραση των συνθηκών συντήρησης επί του προφίλ των FA του καρυδέλαιου είναι ελλιπή. Από την παρούσα μελέτη φάνηκε ότι οι μεταβολές των FA κατά τη συντήρηση παρουσιάζουν διακυμάνσεις ανάλογα με το είδος του FA αλλά και την ποικιλία. Η 'Hartley' εμφανίστηκε ευαίσθητη στην απώλεια των MUFA, καθώς ήταν η μόνη ποικιλία στην οποία εμφανίστηκε μείωση του GO αλλά και οι μεγαλύτερες απώλειες OL. Η 'Franquette' παρουσίασε την μεγαλύτερη ευαισθησία στην απώλεια LL, ενώ μεταξύ των PUFA το LL είχε μεγαλύτερες μέσες απώλειες από το LN. Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.4.4 για το PV, η οξείδωση των UFA συμβαίνει κυρίως με τη δράση οξειδωτικών ενζύμων, που έχει βρεθεί ότι τα χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα, και δευτερευόντως μέσω του φαινομένου της αυτό-οξειδωσής (Salcedo et al., 2010). Οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των ποικιλιών όσον αφορά τις απώλειες τους στα διαφορά UFA

μπορούν να αποδοθούν στους ενδογενείς παράγοντες που επηρεάζουν την οξείδωσή των FA (Παράγραφος 2.4.4).

#### **2.4.6. Συμπεράσματα**

Στο παρόν κεφάλαιο μελετήθηκε η συμπεριφορά των αποξηραμένων σπερμάτων κατά τη συντήρηση που αποτελούν το κύριο προϊόν από την καλλιέργεια της καρδιάς. Η συντήρηση των σπερμάτων για 12 mo σε μη ευνοϊκές συνθήκες (20° C συσκευασμένα υπό αέρα) μπορεί να οδηγήσει σε προϊόντα με αποδεκτά ποιοτικά χαρακτηριστικά με βάση την αντίληψη του καταναλωτή (χρώμα, FFA, PV). Ωστόσο, σε αυτές τις συνθήκες συντελείται πολύ σημαντική θρεπτική υποβάθμιση του προϊόντος κυρίως από την άποψη των αντιοξειδωτικών (TP, TAC) η οποία μπορεί να καταγράψει απώλειες έως και κατά 50%, ενώ παρατηρούνται και απώλειες της τάξεως ~10% σε ουσιώδη UFA.

Η συντήρηση σε θερμοκρασία 1° C ή/και σε συσκευασία υπό N<sub>2</sub> ή CO<sub>2</sub> περιορίζουν αθροιστικά τις απώλειες της θρεπτικής αξίας, ενώ παράλληλα οδηγούν σε προϊόντα καλύτερης ποιότητας ως προς το χρώμα, τα FFA και το PV. Μάλιστα στις περιπτώσεις που δεν είναι δυνατή η συντήρηση των καρδιών σε ψυκτικό θάλαμο ή/και για λόγους εξοικονόμησης ενέργειας, η χαμηλή θερμοκρασία (1° C) υπό αέρα μπορεί να υποκατασταθεί με συντήρηση στους 20° C σε συσκευασίες υπό N<sub>2</sub> ή CO<sub>2</sub>, καθώς για τα περισσότερα χαρακτηριστικά αυτές οι συνθήκες συντήρησης είχαν παρόμοιες επιδράσεις. Η συμπεριφορά των τεσσάρων ποικιλιών κατά τη συντήρηση ήταν παρόμοια, ωστόσο τα αρχικά τους χαρακτηριστικά επηρεάζουν και τη μετέπειτα ποιότητά τους στους διάφορους χρόνους συντήρησης. Η 'Chandler' συνδύαζε υψηλή περιεκτικότητα σε LL και LN, η 'Franquette' είχε υψηλό επίπεδο αντιοξειδωτικών (TP, TAC), ενώ η 'Ιόλη' είχε το πιο ανοιχτόχρωμο σπέρμα.

Τα καρύδια έχουν από τα υψηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικών και ουσιωδών λιπαρών οξέων μεταξύ όλων των φυτικών προϊόντων. Για το λόγο αυτό, εντείνονται τα τελευταία χρόνια οι έρευνες που αφορούν την θετική επίδραση της κατανάλωσης καρδιών στην ανθρώπινη υγεία αλλά και η ζήτηση των καταναλωτών για το είδος αυτό ξηρού καρπού. Μέχρι τώρα δεν υπάρχουν στοιχεία που αφορούν την επίδραση των συνθηκών συντήρησης επί της θρεπτικής αξίας των καρδιών. Έτσι κρίνεται επιβεβλημένη η μελέτη των μεταβολών της θρεπτικής αξίας των καρπών κατά τη συντήρηση, έναν τομέα που εξετάστηκε στο παρόν κεφάλαιο. Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, στο μέλλον η έρευνα επί της συντήρησης των καρδιών θα μπορούσε να επικεντρωθεί στη δοκιμή διαφόρων υλικών συσκευασίας, στην εξέταση περισσότερων ποικιλιών αλλά και στη μελέτη άλλων ουσιωδών θρεπτικών συστατικών (ταννίνες, μελατονίνη, τοκοφερόλες).

## 2.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- Abe, L.T., Lajolo, F.M., Genovese, M.I.**, 2010. Comparison of phenol content and antioxidant capacity of nuts. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* **30**, 254-259.
- Açar, Ö., Gökmen, V., Pellegrini, N., Fogliano, V.**, 2009. Direct evaluation of the total antioxidant capacity of raw and roasted pulses, nuts and seeds. *European Food Research and Technology* **229**, 961-969.
- Al-Bachir, M.**, 2004. Effect of gamma irradiation on fungal load, chemical and sensory characteristics of walnuts (*Juglans regia* L.). *Journal of Stored Products Research* **40**, 355-362.
- AOAC**, 1995. Oils and Fats. In: Horwitz, W., (ed.), Official Methods of Analysis, 16th ed. *AOAC, Arlington, VA, USA*, pp. 9-10, 17.
- Amaral, J.S., Casal, S., Pereira, J.A., Seabra, R.M., Oliveira, B.P.P.**, 2003. Determination of sterol and fatty acid compositions, oxidative stability, and nutritional value of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars grown in Portugal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 7698-7702.
- Anderson, K.J., Teuber, S.S., Gobeille, A., Cremin, P., Waterhouse, A.L., Steinberg, F.M.**, 2001. Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. *The Journal of Nutrition* **131**, 2837-2842.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S., Bektaşoğlu, B., Berker, K., Özyurt, D.**, 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* **12**, 1496-1547.
- Arcan, I., Yemencioğlu, A.**, 2009. Antioxidant activity and phenolic content of fresh and dry nuts with or without the seed coat. *Journal of Food Composition and Analysis* **22**, 184-188.
- Arranz, S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F.**, 2008. Antioxidant capacity of walnut (*Juglans regia* L.): contribution of oil and defatted matter. *European Food Research and Technology* **227**, 425-431.
- Bakkalbaşı, E., Yılmaz, Ö.M., Javidipour, I., Artık, N.**, 2012. Effects of packaging materials, storage conditions and variety on oxidative stability of shelled walnuts. *LWT - Food Science and Technology* **46**, 203-209.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J.**, 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'Antioxidant Power': The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* **239**, 70-76.
- Blomhoff, R., Carlsen, M.H., Andersen, L.F., Jacobs Jr, D.R.**, 2006. Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. *British Journal of Nutrition* **96**, S52-S60.

- Boun, H.R., Huxsoll, C.C.**, 1991. Control of minimally processed carrot (*Daucus carota*) surface discoloration caused by abrasion peeling. *Journal of Food Science* **56**, 416-422.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C.**, 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* **28**, 25-30.
- Bravo, L.**, 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **56**, 317-333.
- Bujdos, G., Tóth-Markus, M., Daood, H., Adányi, N., Szentiványi, P.**, 2010. Fruit quality and composition of Hungarian bred walnut cultivars. *Acta Alimentaria* **39**, 35-47.
- Buranasompob, A., Tang, J., Powers, J.R., Reyes, J., Clark, S., Swanson, B.G.**, 2007. Lipoxygenase activity in walnuts and almonds. *LWT - Food Science and Technology* **40**, 893-899.
- Cao, G., Russell, R.M., Lischner, N., Prior, R.L.**, 1998. Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *The Journal of Nutrition* **128**, 2383-2390.
- Carvalho, M., Ferreira, P.J., Mendes, V.S., Silva, R., Pereira, J.A., Jerónimo, C., Silva, B.M.**, 2010. Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food and Chemical Toxicology* **48**, 441-447.
- Cerda, B., Tomas-Barberan, F.A., Espin, J.C.**, 2004. Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: identification of biomarkers and individual variability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 227-235.
- Chipault, J.R.**, 1962. Antioxidants for use in foods. In: Lundberg, W.O. (Ed.), Autooxidation and Antioxidants, Vol II. *Interscience, New York, USA*, pp. 477-542.
- Christopoulos, M.V., Tsantili, E., Papageorgiou, V., Komaitis, M. and Rouskas, D.**, 2010. Effects of package atmosphere and temperature on phenolics, total antioxidant capacity and colour in kernels of 'Franquette' walnuts during 8-month storage. *Acta Horticulturae* **858**, 75-81.
- Colaric, M., Stampar, F., Hudina, M., Solar, A.**, 2006. Sensory evaluation of different walnut cultivars (*Juglans regia* L.). *Acta Agriculturae Slovenica* **87**, 403-413.
- Colaric, M., Veberic, R., Solar, A., Hudina, M., Stampar, F.**, 2005. Phenolic acids, syringaldehyde, and juglone in fruits of different cultivars of *Juglans regia* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 6390-6396.
- Crowe, T., White, P.**, 2003. Oxidation, flavor, and texture of walnuts reduced in fat content by supercritical carbon dioxide. *Journal of the American Oil Chemist' Society* **80**, 569-574.



- Crews, C., Hough, P., Godward, J., Brereton, P., Lees, M., Guiet, S., Winkelmann, W.,** 2005. Study of the main constituents of some authentic walnut oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 4853-4860.
- Cucu, T., Devreese, B., Mestdagh, F., Kerkaert, B., De Meulenaer, B.,** 2011. Protein–lipid interactions during the incubation of whey proteins with autoxidizing lipids. *International Dairy Journal* **21**, 427-433.
- Dogan, M., Akgul, A.,** 2005. Fatty acid composition of some walnut (*Juglans regia* L. ) cultivars from east Anatolia. *Grasas y Aceites* **56**, 328-331.
- FAOSTAT,** 2011. FAOSTAT Database results 2009 (accessed January, 2011). <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>.
- Fasina, O.O., Craig-Schmidt, M., Colley, Z., Hallman, H.,** 2008. Predicting melting characteristics of vegetable oils from fatty acid composition. *LWT - Food Science and Technology* **41**, 1501-1505.
- Feinberg, M., Favier, J.C., Ireland-Ripert, J.,** 1987. Répertoire general des aliments (INRA). *Technique et documentation Lavoisier, Paris, France* p. 189.
- Frankel, E.N.,** 1991. Review. Recent advances in lipid oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **54**, 495-511.
- Fukuda, T., Ito, H., Yoshida, T.,** 2003. Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.). *Phytochemistry* **63**, 795-801.
- Gamli, F.Ö., Hayoglu, I.,** 2007. The effect of the different packaging and storage conditions on the quality of pistachio nut paste. *Journal of Food Engineering* **78**, 443-448.
- Gan, H.L., Man, Y.B.C., Tan, C.P., NorAini, I., Nazimah, S.A.H.,** 2005. Characterisation of vegetable oils by surface acoustic wave sensing electronic nose. *Food Chemistry* **89**, 507-518.
- Germain, E., Aletà, N., Ninot, A., Rouskas, D., Zakinthinos, G., Gomes Pereira, J., Monastra, F., Limongelli, F.,** 1997. Prospections réalisées dans les populations de semis de noyer de l' Espagne, de Grèce, d' Italie et du Portugal: Caractérisation des populations et description en collections d'études des présélections issues de ces prospections. *Options Méditerranée* **16**, 7-40.
- Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A., Hess-Pierce, B., Kader, A.A.,** 2002. Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 4976-4982.
- Gogus, U., Smith, C.,** 2010. n-3 Omega fatty acids: a review of current knowledge. *International Journal of Food Science & Technology* **45**, 417-436.

- Gomes, H.M., Beaudry, R.M., Almeida, D.P.F., Xavier Malcata, F.,** 2010. Modelling respiration of packaged fresh-cut ‘Rocha’ pear as affected by oxygen concentration and temperature. *Journal of Food Engineering* **96**, 74-79.
- Greve, L.C., Labavitch, J.M.,** 1985. Development of rancidity in walnuts. *Walnut Res. Repts. Walnut Mtkg. Board, Sacramento, California*, pp. 235-245.
- Gunduc, N., El, S.N.,** 2003. Assessing antioxidant activities of phenolic compounds of common turkish food and drinks on *in vitro* low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Food Science* **68**, 2591-2595.
- Gurr, M.I.,** 1999. Lipids in nutrition and health: a reapraisal. *The Oily Press, Bridgwater, UK*, pp. 119-161.
- Halvorsen, B.L., Carlsen, M.H., Phillips, K.M., Böhn, S.K., Holte, K., Jacobs Jr, D.R., Blomhoff, R.,** 2006. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *The American Journal of Clinical Nutrition* **84**, 95-135.
- Halvorsen, B.L., Holte, K., Myhrstad, M.C.W., Barikmo, I., Hvattum, E., Remberg, S.F., Wold, A.-B., Haffner, K., Baugerød, H., Andersen, L.F., Moskaug, Û., Jacobs, D.R., Blomhoff, R.,** 2002. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *The Journal of Nutrition* **132**, 461-471.
- Hamilton, R.J., Kalu, C., Prisk, E., Padley, F.B., Pierce, H.,** 1997. Chemistry of free radicals in lipids. *Food Chemistry* **60**, 193-199.
- Hanusa, L.O., Goldschlag, P., Dembitskya, V.M.,** 2008. Identification of cyclopropyl fatty acids in walnut (*Juglans regia* L.) oil. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University of Palacky, Olomouc, Czech Republic* **152**, 41-45.
- Hendrics, L.C., Coates, W.W., Elkins, R.B., McGranahan, G.H., Phillips, H.A., Ramos, D.E., Reil, W.O., Snyder, R.G.,** 1998. Selection of Varieties. In: Ramos, D.E., (Ed.), Walnut Production Manual. *University of California Press, USA*, pp. 86-89.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L.,** 2005. The Chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 1841-1856.
- Jensen, P.N., Sørensen, G., Brockhoff, P., Bertelsen, G.,** 2003. Investigation of packaging systems for shelled walnuts based on oxygen absorbers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 4941-4947.
- Jensen, P.N., Sørensen, G., Engelsen, S.B., Bertelsen, G.,** 2001. Evaluation of Quality Changes in Walnut Kernels (*Juglans regia* L.) by Vis/NIR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 5790-5796.
- Johnson, J.A., Vail, P.V., Soderstrom, E.L., Curtis, C.E., Brandl, D.G., Tebbets, J.S., Valero, K.A.,** 1998. Integration of nonchemical, postharvest treatments for control of

- navel orangeworm (Lepidoptera: Pyralidae) and indianmeal moth (Lepidoptera: Pyralidae) in walnuts. *Stored-Product and Quarantine Entomology* **91**, 1437-1444.
- Jolliffe I.T.**, 2002. Principal Component Analysis 2nd ed., *Springer, NY, USA* pp. 55-187.
- IPGRI**, 1994. Descriptors for walnut (*Juglans* spp.). *International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy*.
- Kader, A.A., Thompson, J.E.**, 2002. Postharvest Handling Systems: Tree Nuts. In: A. Kader (ed.), Postharvest Technology of Horticultural Crops. *University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Oakland, USA*, pp. 399-406.
- Καλτσικης, Π.Ι.**, 1989. Γεωργικός πειραματισμός-Παραγοντικά πειράματα (β' έκδοση). *Εκδόσεις Σταμούλης, Πειραιας, Ελλάδα*, σελ. 115-164.
- Καλτσικης, Π.Ι.**, 1997. Απλά πειραματικά σχέδια. *Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα-Πειραιας, Ελλάδα*, σελ. 116-117.
- Kornsteiner, M., Wagner, K.-H., Elmadfa, I.**, 2006. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chemistry* **98**, 381-387.
- Koyuncu, M.A., Koyuncu, F., Bakir, N.**, 2003. Selected drying conditions and storage period and quality of walnut selections. *Journal of Food Processing and Preservation* **27**, 87-99.
- Kris-Etherton, P., Taylor, D.S., Yu-Poth, S., Huth, P., Moriarty, K., Fishell, V., Hargrove, R.L., Zhao, G., Etherton, T.D.**, 2000. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *The American Journal of Clinical Nutrition* **71**, 179S-188S.
- Labuckas, D.O., Maestri, D.M., Perelló, M., Martínez, M.L., Lamarque, A.L.**, 2008. Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: Antioxidant activity and interactions with proteins. *Food Chemistry* **107**, 607-612.
- Lambertsen, G., Myklestad, H., Braekkan, O.R.**, 1962. Tocopherols in nuts. *Journal of the Science of Food Agriculture* **13**, 617-620.
- Lavedrine, F., Ravel, A., Poupard, A., Alary, J.**, 1997. Effect of geographic origin, variety and storage on tocopherol concentrations in walnuts by HPLC. *Food Chemistry* **58**, 135-140.
- Li, Tsao, R., Yang, R., Kramer, J.K.G., Hernandez, M.**, 2007. Fatty acid profiles, tocopherol contents, and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* var. *cordiformis*) and persian walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 1164-1169.
- Li, Tsao, R., Yang, R., Liu, C., Zhu, H., Young, J.C.**, 2006. Polyphenolic profiles and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* var. *cordiformis*) and persian walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 8033-8040.

- López, A., Pique, M.T., Romero, A., Aleta, N.,** 1995. Influence of cold-storage conditions on the quality of unshelled walnuts. *International Journal of Refrigeration* **18**, 544-549.
- McGuire, R.,** 1992. Reporting of objective colour measurements. *HortScience* **27**, 1254-1255.
- Maguire, L.S., O'Sullivan, S.M., Galvin, K., O'Connor, T.P., O'Brien, N.M.,** 2004. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **55**, 171-178.
- Manzocco, L., Calligaris, S., Mastrocola, D., Nicoli, M.C., Lerici, C.R.,** 2001. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends in Food Science & Technology* **11**, 340-346.
- Martínez, M.L., Labuckas, D.O., Lamarque, A.L., Maestri, D.M.,** 2010. Walnut (*Juglans regia* L.): genetic resources, chemistry, by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**, 1959-1967.
- Martínez, M.L., Maestri, D.M.,** 2008. Oil chemical variation in walnut (*Juglans regia* L.) genotypes grown in Argentina. *European Journal of Lipid Science and Technology* **110**, 1183-1189.
- Martínez, M.L., Mattea, M.A., Maestri, D.M.,** 2006. Varietal and crop year effects in lipid composition of walnut (*Juglans regia*) genotypes. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **83**, 791-796.
- Maskan, M., Karataş, Ş.,** 1998. Fatty acid oxidation of pistachio nuts stored under various atmospheric conditions and different temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **77**, 334-340.
- Maté, J.I., Saltveit, M.E., Krochta, J.M.,** 1996. Peanut and walnut rancidity: Effects of oxygen concentration and relative humidity. *Journal of Food Science* **61**, 465-469.
- Mexis, S.F., Badeka, A.V., Riganakos, K.A., Karakostas, K.X., Kontominas, M.G.,** 2009. Effect of packaging and storage conditions on quality of shelled walnuts. *Food Control* **20**, 743-751.
- Mitcham, E.J., Veltman, R.H., Feng, X., de Castro, E., Johnson, J.A., Simpson, T.L., Biasi, W.V., Wang, S., Tang, J.,** 2004. Application of radio frequency treatments to control insects in in-shell walnuts. *Postharvest Biology and Technology* **33**, 93-100.
- Miyashita, K., Takagi, T.,** 1986. Study on the oxidative rate and prooxidant activity of free fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **63**, 1380-1384.
- Muradoglu, F., Oguz, I.H., Yildiz, K., Yilmaz, H.,** 2010. Some chemical composition of walnut (*Juglans regia* L.) selections from eastern Turkey. *African Journal of Agricultural research* **5**, 2379-1285.

- Nasar-Abbas, S.M., Plummer, J.A., Siddique, K.H.M., White, P.F., Harris, D., Dods, K.,** 2008. Nitrogen retards and oxygen accelerates colour darkening in faba bean (*Vicia faba* L.) during storage. *Postharvest Biology and Technology* **47**, 113-118.
- Özcan, M.M., İman, C., Arslan, D.,** 2010. Physico-chemical properties, fatty acid and mineral content of some walnuts (*Juglans regia* L.) types. *Agricultural Sciences* **1**, 62-67.
- Ozcan, G., Kotuncu, A.M.,** 2005. Physical and chemical composition of some walnuts (*Juglans regia* L.) genotypes grown in Turkey. *Grassas y Aceites* **56**, 141-146.
- Paradiso, V.M., Gomes, T., Nasti, R., Caponio, F., Summo, C.,** 2010. Effects of free fatty acids on the oxidative processes in purified olive oil. *Food Research International* **43**, 1389-1394.
- Park, P.W., Goins, R.E.,** 1994. *In situ* preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *Journal of Food Science* **59**, 1262-1266.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Salvatore, S., Del Rio, D., Bianchi, M., Brighenti, F.,** 2006. Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. *Molecular Nutrition & Food Research* **50**, 1030-1038.
- Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L.,** 2008. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology* **46**, 2103-2111.
- Ποντίκης, Κ.,** 2000. Ειδική Δενδροκομία , Τόμος Δεύτερος, Ακρόδρυα – Πυρηνόκαρπα – Λοιπά Καρποφόρα. *Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα-Πειραιας, Ελλάδα, σελ.* 103-104.
- Prior, R.L., Cao, G.,** 1999. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods<sup>1</sup>. *Free Radical Biology and Medicine* **27**, 1173-1181.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K.,** 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 4290-4302.
- Rabrenovic, B., Dimic, E., Maksimovic, M., Sobajic, S., Gajic-Krstajic. L.,** 2011. Determination of fatty acid and tocopherol compositions and the oxidative stability of (*Juglans regia* L.) cultivars grown in Serbia. *Czech Journal of Food Science* **29**, 74-78.
- Rabrenovic, B., Picuric-Jovanovic, K., Sobajic, S.,** 2008. Physicochemical properties and fatty acid composition of *Juglans regia* cultivars grown in Serbia. *Chemistry of Natural Compounds* **44**, 151-154.

- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G.,** 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* **20**, 933-956.
- Robards, K., Kerr, A.F., Patsalides, E.,** 1988. Rancidity and its measurement in edible oils and snack foods. A review. *Analyst* **113**, 213-224.
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W.,** 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* **66**, 401-436.
- Robinson, D.S., Wu, Z., Domoney, C., Casey, R.,** 1995. Lipoxygenases and the quality of foods. *Food Chemistry* **54**, 33-43.
- Ρούσκας, Δ.,** 2006. Μονογραφίες καλλιεργούμενων στην Ελλάδα ποικιλιών καρυδιάς. *ΕΘΙΑΓΕ* **24**, 13-19.
- Simopoulos, A.P.,** 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine* **233**, 674-688.
- St. Angelo, A.J., Vercellotti, J., Jacks, T., Legendre, M.,** 1996. Lipid oxidation in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **36**, 175-224.
- Salcedo, C.L., López de Mishima, B.A., Nazareno, M.A.,** 2010. Walnuts and almonds as model systems of foods constituted by oxidisable, pro-oxidant and antioxidant factors. *Food Research International* **43**, 1187-1197.
- Scott, G.,** 1997. Antioxidants in science, technology, medicine and nutrition. *Albion Publishing, Chichester, UK*, pp. 80-92.
- Shin, Y., Liu, R.H., Nock, J.F., Holliday, D., Watkins, C.B.,** 2007. Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. *Postharvest Biology and Technology* **45**, 349-357.
- Sinensio, F., Moneta, E.,** 1997. Sensory evaluation of walnut fruit. *Food Quality and Preference* **8**, 35-43.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M.,** 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* **299**, 152-178.
- Souci, S.W., Fachmann, W., Kraut, H.,** 1994. Food composition and nutrition tables. *CRC Press, Stuttgart Germany* pp. 955-956.
- Talcott, S.T., Duncan, C.E., Pozo-Insfran, D.D., Gorbet, D.W.,** 2005. Polyphenolic and antioxidant changes during storage of normal, mid, and high oleic acid peanuts. *Food Chemistry* **89**, 77-84.

- Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C.,** 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**, 853-876.
- Tsantili, E., Konstantinidis, K., Athanasopoulos P.E., Pontikis, C.,** 2002. Effects of postharvest calcium treatments on respiration and quality attributes in lemon fruit during storage. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **77**, 479-484.
- Tsantili, E., Konstantinidis, K., Christopoulos, M.V., Roussos, P.A.,** 2011. Total phenolics and flavonoids and total antioxidant capacity in pistachio (*Pistachia vera* L.) nuts in relation to cultivars and storage conditions. *Scientia Horticulturae* **129**, 694-701.
- Tsantili, E., Shin, Y., Nock, J.F., Watkins, C.B.,** 2010. Antioxidant concentrations during chilling injury development in peaches. *Postharvest Biology and Technology* **57**, 27-34.
- Vanhanen, L.P., Savage, G.P.,** 2006. The use of peroxide value as a measure of quality for walnut flour stored at five different temperatures using three different types of packaging. *Food Chemistry* **99**, 64-69.
- Venkatachalam, M., Sathe, S.K.,** 2006. Chemical composition of selected edible nut seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 4705-4714.
- Vinson, J.A., Dabbagh, Y.A., Serry, M.M., Jang, J.,** 1995. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 2800-2802.
- von Gadow, A., Joubert, E., Hansmann, C.F.,** 1997. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*),  $\alpha$ -tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 632-638.
- Wall, M.M.,** 2010. Functional lipid characteristics, oxidative stability, and antioxidant activity of macadamia nut (*Macadamia integrifolia*) cultivars. *Food Chemistry* **121**, 1103-1108.
- Wang, S., Ikediala, J.N., Tang, J., Hansen, J.D., Mitcham, E., Mao, R., Swanson, B.,** 2001. Radio frequency treatments to control codling moth in in-shell walnuts. *Postharvest Biology and Technology* **22**, 29-38.
- Wang, S., Monzon, M., Johnson, J.A., Mitcham, E.J., Tang, J.,** 2007. Industrial-scale radio frequency treatments for insect control in walnuts II: Heating uniformity and energy efficiency. *Postharvest Biology and Technology* **45**, 240-246.
- Wang, S., Tang, J., Sun, T., Mitcham, E.J., Koral, T., Birla, S.L.,** 2006. Considerations in design of commercial radio frequency treatments for postharvest pest control in in-shell walnuts. *Journal of Food Engineering* **77**, 304-312.

- Warmund, M.R., Elmore, J., Drake, M., Yates, M.D.,** 2009. Descriptive analysis of kernels of selected black and Persian walnut cultivars. *Journal of the Science of Food Agriculture* **89**, 117-121.
- Wilson-Kakashita, G., Gerdes, D.L., Hall, W.R.,** 1995. The effect of gamma irradiation on the quality of english walnuts (*Juglans regia*). *LWT - Food Science and Technology* **28**, 17-20.
- Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L.,** 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 4026-4037.
- Yang, J., Liu, R.H., Halim, L.,** 2009. Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds. *LWT - Food Science and Technology* **42**, 1-8.
- Zacheo, G., Cappello, A.R., Perrone, L.M., Gnoni, G.V.,** 1998. Analysis of factors influencing lipid oxidation of almond seeds during accelerated ageing. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **31**, 6-9.
- Zacheo, G., Cappello, M.S., Gallo, A., Santino, A., Cappello, A.R.,** 2000. Changes associated with post-harvest ageing in almond seeds. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **33**, 415-423.



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

---

### Εξεταζόμενες ποικιλίες

Chandler



Hartley



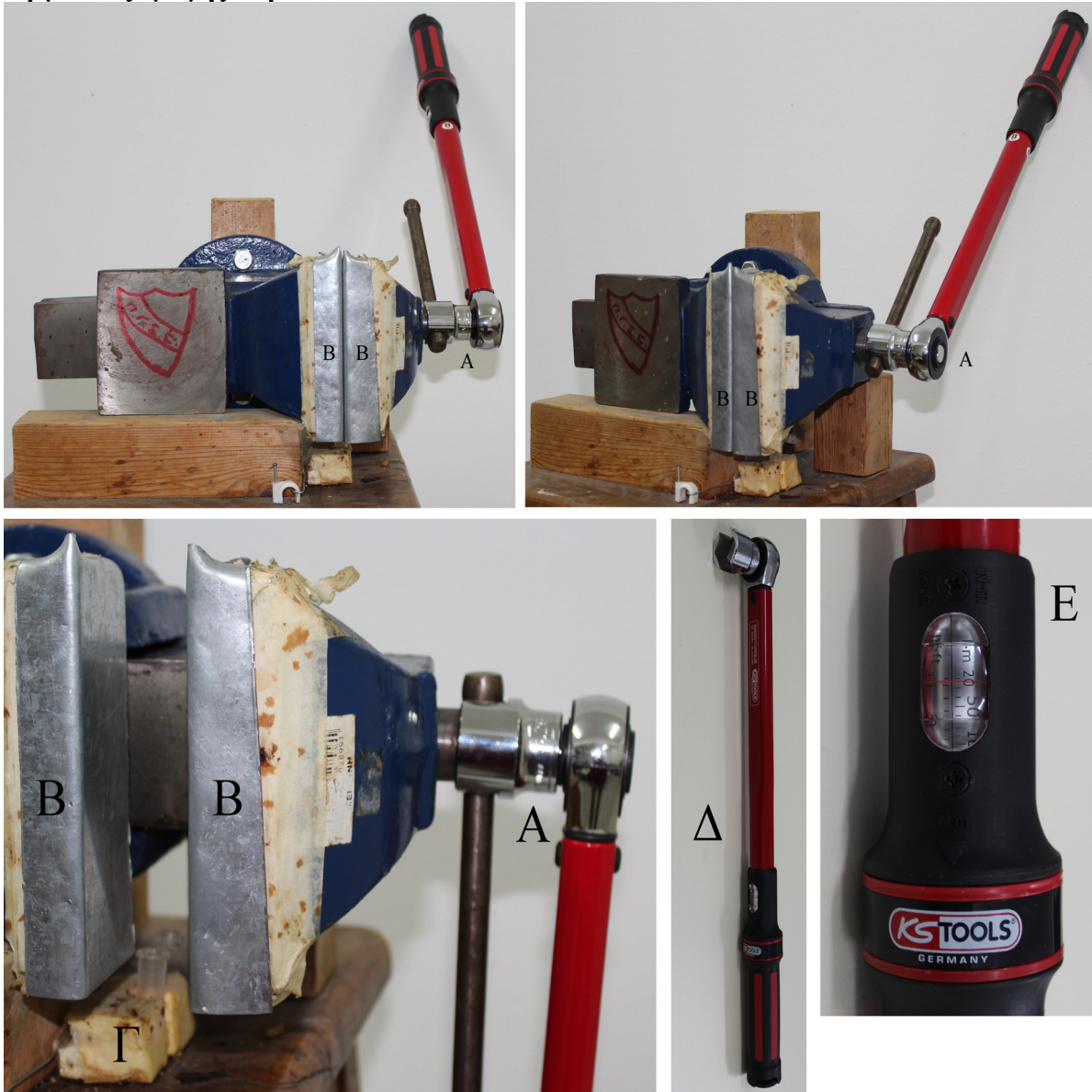
Franquette



Ιόλη



## Όργανο εξαγωγής καρυδέλαιου



- A: Περιστροφικός κοχλίας άσκησης πίεσης
- B: Περιοριστικές πλάκες σύνθλιψης
- Γ: Συλλογή καρυδέλαιου
- Δ: Όργανο καταμέτρησης ροπής στρέψης
- E: Ρυθμιστής ροπής στρέψης

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**

---

*Μετά-συλλεκτική συμπεριφορά ενδοκαρπίων και σπερμάτων νωπών καρυδιών - Επίδραση της χαμηλής θερμοκρασίας επί των φαινολικών συστατικών*



## Περίληψη

Οι μη αποξηραμένοι καρποί καρυδιάς (νωπά ή φρέσκα καρύδια) αποτελούν ένα λιγότερο διαδεδομένο προϊόν της καλλιέργειας αυτού του φυτικού είδους, οι οποίοι είναι δημοφιλείς σε πολλά μέρη του πλανήτη. Τα νωπά σπέρματα της καρυδιάς θεωρούνται πολύ ευπαθή κατά τη συντήρησή τους, ωστόσο δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα όσον αφορά την ποιότητά κατά τη συντήρησή τους, αλλά ούτε και τη φυσιολογία τους. Παράλληλα, ενώ τα καρύδια θεωρούνται εξαιρετική πηγή φαινολικών, τα δεδομένα που αφορούν το μεταβολισμό αυτών των ουσιών στο σπέρμα είναι περιορισμένα.

Στο παρόν κεφάλαιο σκοπός ήταν να μελετηθεί η συντήρηση των νωπών καρυδιών με έμφαση στα φαινολικά συστατικά. Δεδομένης της έλλειψης στοιχείων σχετικά με τα νωπά καρύδια εξετάστηκε αρχικά η συντήρησή σπερμάτων (με- ή χωρίς-κέλυφος) σε θερμοκρασία 1° C μέχρι 40 d. Σε σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών (Chandler, Franquette, Hartley, Ιόλη) μελετήθηκαν χαρακτηριστικά φυσιολογικά (αναπνοή και έκλυση αιθυλενίου) και ποιοτικά σύμφωνα με την αντίληψη του καταναλωτή (χρώμα σπέρματος), ενώ συγχρόνως εξετάστηκε η αναπνοή, η έκλυση αιθυλενίου και η σκληρότητα του κελύφους ολόκληρου του ενδοκαρπίου (OE). Παράλληλα, εξετάστηκαν τα ολικά φαινολικά (TP) και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) των σπερμάτων, εκτιμούμενη με τις μεθόδους FRAP και DPPH. Πριν τη συντήρηση, τα νωπά σπέρματα της 'Franquette' είχαν τα υψηλότερα επίπεδα TP και TAC, ενώ 'Chandler' και 'Ιόλη' είχαν το πιο ανοιχτόχρωμο σπέρμα. Κατά τη συντήρηση, στα σπέρματα και τα OE όλων των ποικιλιών, παρατηρήθηκε προοδευτική απώλεια βάρους, μείωση της αναπνοής τους, ενώ δεν ανιχνεύθηκε παραγωγή αιθυλενίου. Η συντήρηση οδήγησε σε προοδευτικό καφέτιασμα των σπερμάτων (μειώσεις των παραμέτρων  $L^*$  και  $h^o$  του χρώματος) το οποίο περιορίστηκε ελαφρά στα σπέρματα που συντηρήθηκαν με-κέλυφος. Η σκληρότητα του κελύφους δεν μεταβλήθηκε κατά τη συντήρηση έως και την τεσσαρακοστή ημέρα. Κατά τη συντήρηση, αυξήσεις των TP και της TAC βρέθηκαν στα σπέρματα όλων των ποικιλιών συντηρημένα τόσο με- όσο και χωρίς-κέλυφος, οι οποίες ήταν εντονότερες κατά τις 20 πρώτες ημέρες. Η ύπαρξη κελύφους στα σπέρματα δεν επηρέασε τα επίπεδα των τιμών TP, FRAP και DPPH. Από την εξέταση των επιπέδων των TP μεταξύ νωπών και αποξηραμένων σπερμάτων προέκυψε ότι κατά την αποξήρανση παρατηρείται απώλεια TP της τάξης του 15%. Ωστόσο όπως βρέθηκε σε επόμενο πειραματικό μέρος, οι αυξημένες τιμές TP μετά την έκθεση νωπών καρυδιών στον 1° C μέχρι 20 d παρέμειναν ακόμα και μετά την αποξήρανση (στους 36° C για 24 h), οδηγώντας σε βελτίωση της θρεπτικής αξίας όχι μόνο των νωπών αλλά και των αποξηραμένων σπερμάτων.

Η άνοδος των αντιοξειδωτικών κατά τη συντήρηση μελετήθηκε περαιτέρω σε νωπά σπέρματα της 'Franquette' συντηρούμενα για 0, 1, 4, 7, 10, 20 και 30 d στον 1° C ή τους 8° C. Κατά τη συντήρηση στον 1° C, προέκυψαν αυξήσεις των τιμών TP, FRAP και DPPH, ενώ τα

παραπάνω χαρακτηριστικά δεν μεταβλήθηκαν κατά τη συντήρηση στους 8° C. Παράλληλα, προσδιορίστηκαν επτά μεμονωμένα φαινολικά συστατικά, των οποίων η ύπαρξη στο σπέρμα της καρδιάς επιβεβαιώθηκε και με τη χρήση φασματογράφου μαζών (MS). Τα προσδιορισμένα φαινολικά ανήκουν στην κλάση των υδροξυβενζοϊκών και ήταν σε φθίνουσα συγκέντρωση τα ελλαγικό οξύ (EL) > πρωτοκατεχικό οξύ (PC) > βανιλικό οξύ (VA) > αιθυλεστέρας του πρωτοκατεχικού (PCE) > συρινγικό οξύ (SY) > 2,4-διϋδροξυβενζοϊκό οξύ (DHB) > 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (HB). Όλα τα φαινολικά ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση φασματογράφου μαζών (HPLC-MS) και η ύπαρξη των DHB και PCE στα σπέρματα της καρδιάς επιβεβαιώθηκε για πρώτη φορά. Κατά την συντήρηση στον 1° C οι συγκεντρώσεις των HB, DHB, PC, VA, SY και EL αυξήθηκαν, ενώ στους 8° C αυξήθηκαν μόνο τα DHB και SY σε μικρότερο βαθμό. Το PCE είχε πτωτική τάση και στις δύο θερμοκρασίες, με την μεγαλύτερη μείωση να παρατηρείται στους 8° C. Οι παραπάνω μεταβολές των επιπέδων των φαινολικών στον 1° C πιθανόν να προήλθαν από ενεργοποίηση του μεταβολισμού των φαινυλπροπανοειδών (PhP), ένα μονοπάτι στο οποίο το ένζυμο κλειδί είναι η φαινυλαλανίνη αμμωνία-λυάση (PAL). Χειρισμοί με 2-aminoindane-2-phosphonic acid (AIP, παρεμποδιστής δράσης της PAL), actinomycin D (ACT, παρεμποδιστής μεταγραφής mRNA), cordycepin (COR, παρεμποδιστής σύνθεσης RNA) και cycloheximide (CHX, παρεμποδιστής σύνθεσης πρωτεϊνών) παρεμπόδισαν την αύξηση των TP στα σπέρματα που είχαν εκτεθεί στον 1° C.

Σε επόμενο πειραματικό μέρος, μελετήθηκαν οι μεταβολές των φαινολικών σε σπέρματα της 'Franquette' εκτεθειμένα στον 1° C για 20 d, σε συνδυασμό με χειρισμούς AIP, ACT, COR, CHX και τους συνδυασμούς τους ανά δύο. Παράλληλα, εξετάστηκαν οι ενεργότητες (ειδική και ολική) των ενζύμων PAL, πολυφαινολοξειδάση (PPO) και υπεροξειδάση (POD). Τα αποτελέσματα έδειξαν στους μάρτυρες αύξηση των TP, HB, DHB, PC, VA, SY και EL, όπως και τα προηγούμενα έτη, με παράλληλη αύξηση των ενεργοτήτων των PAL, PPO και POD. Από τη μελέτη των μεταβολών όλων των παραπάνω χαρακτηριστικών σε σχέση με τους χειρισμούς των παρεμποδιστών επιβεβαιώθηκε η ενεργοποίηση του PhP υπό την επίδραση της χαμηλής θερμοκρασίας. Η αύξηση της ενεργότητας των ενζύμων PAL, PPO και POD προήλθε τόσο από την ενεργοποίησή τους όσο και πιθανόν από τη *de novo* σύνθεσή τους. Τέλος προέκυψε ότι η συσσώρευση των HB, DHB, VA, SY πιθανά γίνεται μέσω του PhP, του PC πιθανά γίνεται εκτός του PhP, ενώ στην συσσώρευση του EL είναι πιθανόν να συνεισφέρει μερικώς το PhP.

#### **3.1.1. Νωπά ή φρέσκα ή μη-αποξηραμένα καρύδια**

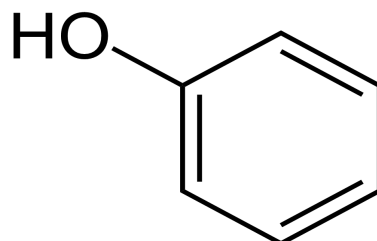
Οι αποξηραμένοι καρποί είναι το κύριο προϊόν της καλλιέργειας της καρυδιάς, και τα αποξηραμένα σπέρματα αποτελούν το εδώδιμο μέρος το οποίο συνήθως διατίθεται με- ή χωρίς-κέλυφος. Ωστόσο, οι μη επεξεργασμένοι-αποξηραμένοι καρποί της καρυδιάς αποτελούν ένα λιγότερο διαδεδομένο προϊόν της καλλιέργειας αυτού του φυτικού είδους. Τα νωπά καρύδια, όπως αποκαλούνται (EN: fresh ή wet walnuts, FR: noix fraîches), χαίρουν μεγάλης εκτίμησης λόγω της μοναδικής τους γεύσης και αρώματος, και είναι αρκετά δημοφιλή σε πολλά μέρη του πλανήτη (McGranahan and Leslie, 1991). Παράλληλα, πιστεύεται ότι τα νωπά καρύδια υπερέχουν έναντι των αποξηραμένων ως προς τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες, δεδομένου ότι κατά την επεξεργασία ή/και την αποξήρανση των φυτικών προϊόντων μπορεί να συμβεί απώλεια αντιοξειδωτικών (Ballisteri et al., 2009; Manzoco et al., 2001; Tsantili et al., 2011). Οι Arcan and Yemencioğlu, (2009) βρήκαν ότι τα νωπά καρύδια υπερείχαν των αποξηραμένων όσον αφορά τα ολικά φαινολικά (TP) και την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). Συγκεκριμένα, οι παραπάνω ερευνητές ανέφεραν τιμές των TP 7,55 mg GAE g<sup>-1</sup> και της TAC 110,8 μmol TAE g<sup>-1</sup> για τα νωπά, ενώ στα αποξηραμένα οι τιμές των TP και της TAC ήταν 5,89 mg GAE g<sup>-1</sup> και 90,5 μmol TAE g<sup>-1</sup>, αντίστοιχα. Ωστόσο, στην παραπάνω έρευνα τόσο τα νωπά όσο και τα αποξηραμένα καρύδια ήταν από την αγορά χωρίς να διευκρινίζεται εάν ήταν καρποί της ίδιας ποικιλίας, του ίδιου σταδίου συγκομιδής και πως είχαν επεξεργαστεί.

#### **3.1.2. Συντήρηση νωπών καρπών Ακρόδρυων**

Η συντήρηση των αποξηραμένων καρυδιών έχει μελετηθεί αρκετά και έχουν εξεταστεί πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα του προϊόντος. Ωστόσο, δεν υπάρχουν δεδομένα για την συμπεριφορά των νωπών καρυδιών κατά τη συντήρηση. Ελάχιστα είναι και τα δεδομένα για τη συντήρηση των νωπών προϊόντων από είδη που καλλιεργούνται για την παραγωγή ξηρών καρπών. Τα νωπά φουντούκια, που ως κύριο πρόβλημα τους αναφέρεται η συντήρηση, συντηρούνται καλύτερα για 12 d στους 4° C σε σχέση με τους 10° C, από την άποψη του χρώματος και των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών (Moscetti et al., 2012). Για τα κάστανα, αναφέρεται ανθεκτικότητα στις χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης, και προτείνεται η συντήρησή τους στους -1° C με -2° C (Cecchini et al., 2011; Jermini et al., 2006; Mencarelli et al., 1982; Rouves and Prunet, 2002).

### 3.1.3. Φυτικές φαινολικές ενώσεις

Φαινολικές ενώσεις ή φαινολικά (Σχήμα 3.1) καλούνται γενικά όλες οι ενώσεις που περιέχουν στο μόριο τους μια ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου (OH) συνδεδεμένες σε έναν φαινολικό (αρωματικό) δακτύλιο (C<sub>6</sub>) (Vermerris and Nicholson, 2008).



Σχήμα 3. 1. Η χαρακτηριστική ομάδα της φαινόλης (μετατροπή από Brano, 1998)

Ο όρος φαινολικά καλύπτει ένα πολύ μεγάλο και ποικίλο σύνολο χημικών ουσιών που μπορούν να ταξινομηθούν με διάφορους τρόπους (Vermerris and Nicholson, 2008). Ένας αναλυτικός τρόπος ταξινόμησης των φαινολικών (Πίνακας 3.1) είναι με βάση τον αριθμό των ατόμων άνθρακα στο μόριο (Goodwin and Mercer, 1983; Harborne and Simmonds, 1964). Τα φαινολικά μπορούν να διαχωριστούν σε απλές, χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις με έναν αρωματικό δακτύλιο και σύνθετες, μεγάλου μοριακού βάρους

Πίνακας 3. 1. Ταξινόμηση των φαινολικών ενώσεων με βάση τον αριθμό των ατόμων άνθρακα (C) στο μόριο.

Βασική ανθρακική δομή	Κλάση φαινολικών ουσιών
C <sub>6</sub>	Απλά φαινολικά (φαινόλες)
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Φαινολικά οξέα και αλδεΐδες
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Ακετοφαινόλες, φαινυλοξικά οξέα
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Κινναμικά οξέα
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Κουμαρίνες, χρωμόνες
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Ναφθοκινόνες
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Ξανθόνες
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Φλαβάνες
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Φλαβόνες
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Φλαβανόνες
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Φλαβανόλες
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Ανθοκυανιδίνες
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Ανθοκυανίνες
[C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ] <sub>2</sub>	Λιγνάνες, νεολιγνάνες
[C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ] <sub>2</sub>	Μπιφλαβονοειδή
[C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ] <sub>n</sub>	Λιγνίνες
[C <sub>6</sub> ] <sub>n</sub>	Μελανίνες
[C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ] <sub>n</sub>	Ταννίνες

ενώσεις, όπως ταννίνες και άλλα πολύ-φαινολικά παράγωγα (Brano, 1998). Τα φαινολικά μπορούν επίσης να διαχωριστούν ως 'συνήθη' ή 'κοινά' και 'μη-συνήθη' ή 'μη κοινά' (Swain

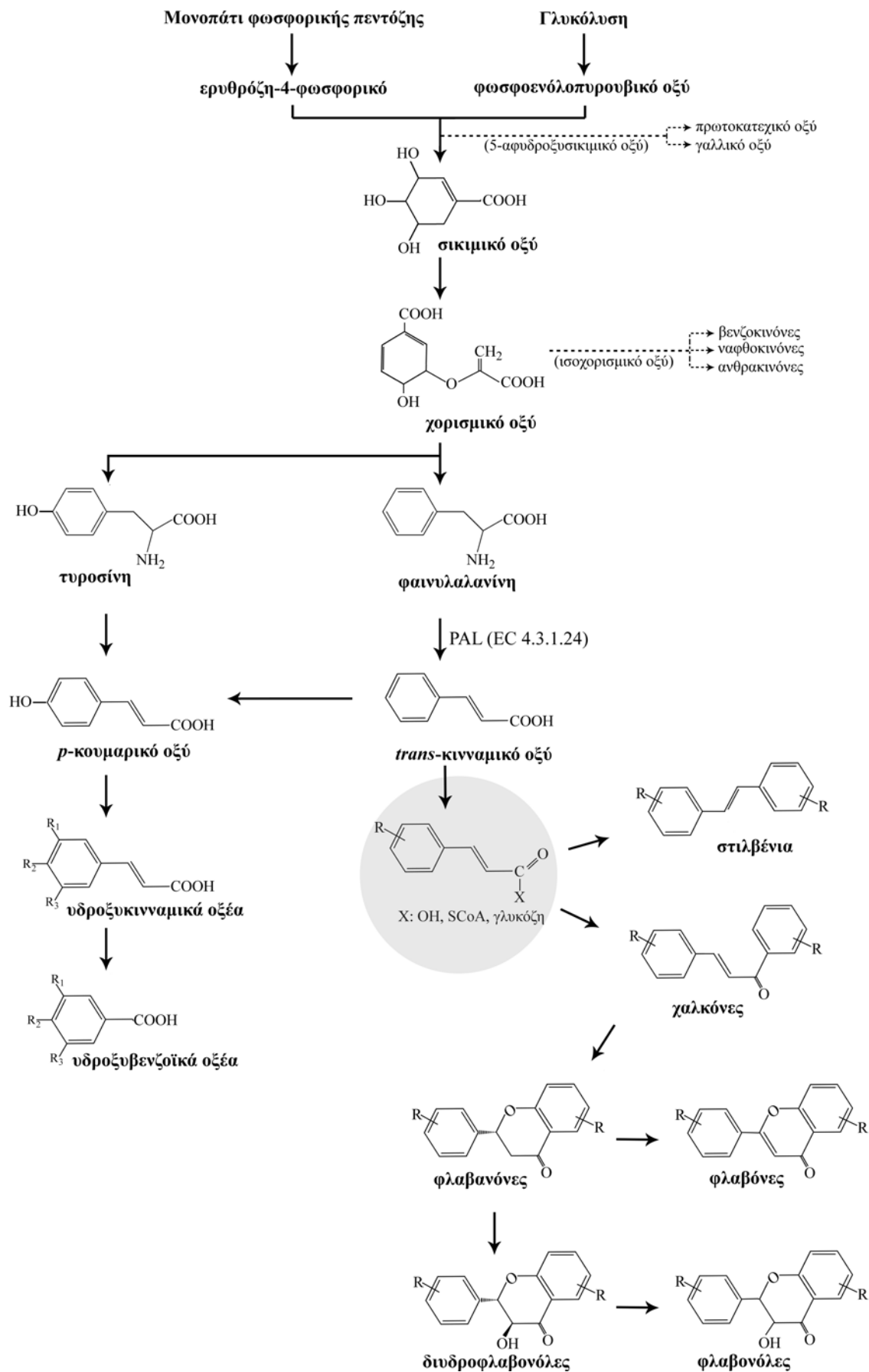


and Bate-Smith, 1962), ενώ σύμφωνα με τον Ribereau-Gayon (1972) μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις οικογένειες ως:

- i) Ευρέως διαδεδομένα φαινολικά που απαντώνται σε όλα τα φυτά.
- ii) Φαινολικά που είναι λιγότερο διαδεδομένα.
- iii) Φαινολικά που απαντώνται ως πολυμερή.

#### ***3.1.4. Βιοσύνθεση φαινολικών στα φυτά***

Οι φαινολικές ενώσεις που απαντώνται στους φυτικούς ιστούς είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που βιοσυντίθενται από το μονοπάτι του σικιμικού οξέως (ShP, Shikimic acid pathway) και το μονοπάτι των φαινυλπροπανοειδών (PhP, Phenylpropanoid pathway) (Σχήμα 3.2).



**Σχήμα 3. 2.** Συνοπτική παρουσίαση βιοσύνθεσης των διαφόρων κλάσεων φαινολικών ενώσεων.

Το ShP, το οποίο μπορεί να διαιρεθεί σε τρία στάδια (Seigler, 1998), οδηγεί στο σχηματισμό των τριών αρωματικών αμινοξέων φαινυλαλανίνη (*L*-phenylalanine), τυροσίνη (*L*-tyrosine) και τρυπτοφάνη (*L*-tryptophan) (Strack, 1997). Κατά το πρώτο στάδιο μέσω μιας αντίδρασης συμπύκνωσης (condensation reaction) και κατόπιν κυκλοποίησης (cyclization) παράγεται το σικιμικό οξύ (Σχήμα 3.2). Στο δεύτερο στάδιο, από το σικιμικό οξύ παράγεται το χορισμικό οξύ (chorismic acid) το οποίο αποτελεί σημαντικό ενδιάμεσο κρίκο από τον οποίο παράγονται πολλοί δευτερογενείς μεταβολίτες. Στο τρίτο στάδιο γίνεται μετατροπή του χορισμικού οξέος σε άλλους μεταβολίτες, δύο από τους οποίους είναι η φαινυλαλανίνη και η τυροσίνη, οι οποίες αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για την σημαντική κλάση των φαινολικών μέσω είτε του PhP ή άλλων μεταβολικών μονοπατιών (Vermerris and Nicholson, 2008). Αρκετά φαινολικά που απαντώνται στα φυτά (γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ) υποστηρίζεται ότι παράγονται από ενδιάμεσα προϊόντα του ShP (Goodwin and Mercer, 1983; Seigler, 1998), αν και τα δεδομένα είναι αντικρουόμενα σχετικά με την υπόθεση αυτή (Seigler, 1998; Strack, 1997).

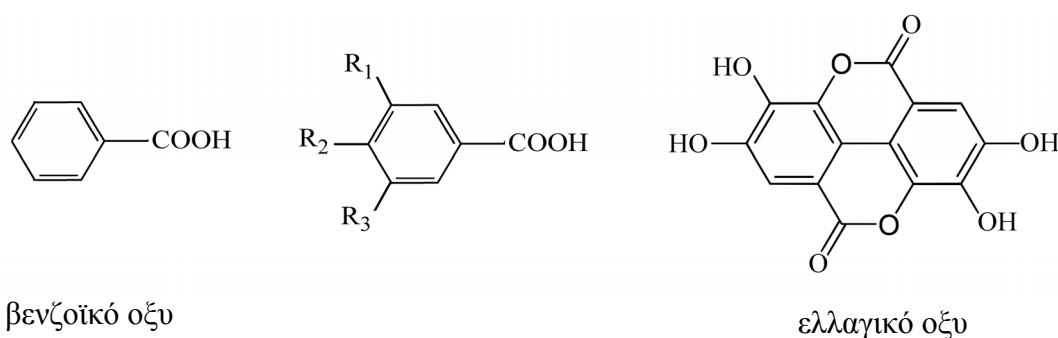
Το PhP ορίζεται και ως ‘γενικός μεταβολισμός φαινυλπροπανοειδών’ όπου μέσω του μεταβολισμού της φαινυλαλανίνης παράγεται ένας μεγάλος αριθμός φαινολικών (Strack, 1997). Η σύνδεση μεταξύ της φαινυλαλανίνης και του δευτερογενούς μεταβολισμού των φαινυλπροπανοειδών ελέγχεται από το ένζυμο φαινυλαλανίνη αμμωνία-λυάση (PAL, phenylalanine ammonia-lyase, EC 4.3.1.24). Η PAL καταλύει τη μη οξειδωτική από-αμίνωση της φαινυλαλανίνης και έτσι σχηματίζεται η πρώτη φαινυλοπροπανική δομή. Κατά την παραπάνω διαδικασία η αμμωνία (NH<sub>3</sub>) απομακρύνεται, συμπεριλαμβάνοντας και το *pro*-3S υδρογόνο (H) από το τρίτο άτομο άνθρακα (C-3), ώστε να προκύψει το *trans*-κινναμικό οξύ (*E*-cinnamic acid ή *trans*-cinnamic acid). Στη συνέχεια το *trans*-κινναμικό οξύ υδροξυλιώνεται όπου προκύπτει το *p*-κουμαρικό οξύ (*p*-coumaric acid) και έπειτα μέσω διαφόρων μεταβολικών μονοπατιών παράγονται άλλα φαινολικά συστατικά όπως υδροξυβενζοϊκά οξέα, υδροξυκινναμικά οξέα και φλαβονοειδή. Μια συνοπτική διαγραμματική απεικόνιση του δευτερογενούς μεταβολισμού κατά τον οποίο παράγονται οι διάφορες κλάσεις των φαινολικών παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.2.

### **3.1.5. Ευρέως διαδεδομένα φαινολικά-φύση και κατανομή των φαινολικών στην καρδιά**

Όπως αναλύθηκε στο δεύτερο κεφάλαιο τα καρύδια έχουν πολύ υψηλά επίπεδα φαινολικών ουσιών τα οποία συνισφένουν σημαντικά και στην TAC. Ωστόσο, μόνο ένας μικρός αριθμός μεμονομένων φαινολικών ενώσεων των καρυδιών έχει ταυτοποιηθεί.

### 3.1.5.1. Υδροξυβενζοϊκά οξέα

Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) είναι παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (Σχήμα 3.3) και απαντώνται ευρέως στους φυτικούς ιστούς είτε ελεύθερα είτε δεσμευμένα ως εστέρες ή γλυκοζίτες (Seigler, 1998). Η ποικιλομορφία της δομής των υδροξυβενζοϊκών οξέων, στηρίζεται στον αριθμό και τη διάταξη των υδροξυλίων και των μεθυλομάδων στον αρωματικό δακτύλιο (Crozier et al., 2009). Τα κυριότερα οξέα της κατηγορίας είναι τα *p*-υδροξυβενζοϊκό (HB), πρωτοκατεχικό (PC), γεντιστικό, βανιλικό (VA), συρινγικό (SY), σαλικυλικό, γαλλικό (GA) και ελλαγικό (EL) (Σχήμα 3.3) (Seigler, 1998; Strack, 1997; Vermerris and Nicholson, 2008).



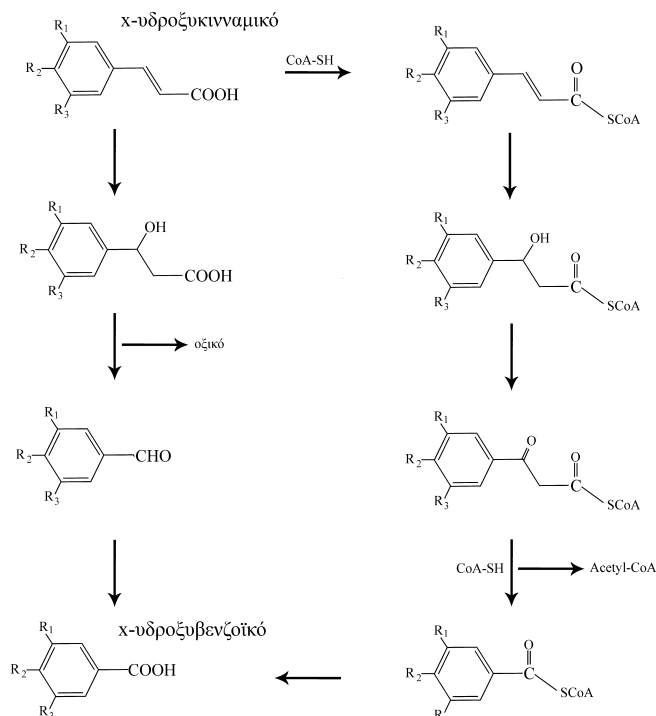
Οξύ		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<i>p</i> -υδροξυβενζοϊκό	4-υδροξυβενζοϊκό	H	OH	H
πρωτοκατεχικό	3,4- διυδροξυβενζοϊκό	OH	OH	H
γεντιστικό	2,5- διυδροξυβενζοϊκό	H	OH	OH
βανιλικό	4- υδρο-3-μέθοξυβενζοϊκό	OCH <sub>3</sub>	OH	H
συρινγικό	3,5-διυδροξυβενζοϊκό	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
γαλλικό	3,4,5- τριυδροξυβενζοϊκό	OH	OH	OH

**Σχήμα 3. 3.** Χημική δομή των ευρέως διαδεδομένων υδροξυβενζοϊκών οξέων (Προσαρμογή από Shahidi and Naczki, 2004).

Τα οξέα GA και EL απαντώνται κυρίως υπό δεσμευμένη μορφή, ως γαλλοταννίνες και ελλαγοταννίνες αντίστοιχα (Strack, 1997). Στην καρυδιά, από τα κοινά υδροξυβενζοϊκά οξέα το HB, το PC, το VA, το SY, το GA και το EL έχουν προσδιοριστεί, είτε ελεύθερα είτε δεσμευμένα, στο σπέρμα (Anderson et al., 2001; Cerda et al., 2004; Colaric et al., 2005; Gómez-Caravaca et al., 2008; Li et al., 2006; Mahoney and Molyneux, 2004; Shimoda et al., 2008; Verardo et al., 2009; Zhang et al., 2009), στο περικάρπιο (Stampar et al., 2006; Cosmulescu et al., 2010; Matok et al., 2009; Sharma et al., 2009) και τους βλαστούς (Solar et al., 2006).

Τα αποτελέσματα που αφορούν τη βιοσύνθεση των υδροξυβενζοϊκών οξέων είναι αντικρουόμενα (Vermerris and Nicholson, 2008). Ανάλογα με το φυτικό είδος, υπάρχουν διάφορα πιθανά μονοπάτια που οδηγούν στη σύνθεση αυτής της κλάσης των φαινολικών (Strack, 1997; Wildermuth, 2006). Μια κύρια πιθανή οδός είναι μέσω του PhP με αποδόμηση

της πλευρικής ανθρακικής αλυσίδας των υδροξυκιναμικών και απομάκρυνση ενός οξικού (Chakraborty et al., 2009; Sircar and Mitra, 2009). Η διαδικασία αυτή μπορεί να συμβαίνει με την εμπλοκή ή όχι του συνενζύμου A (CoA, coenzyme A) (Strack, 1997). Η αλληλουχία των αντιδράσεων που προτείνεται είναι ανάλογη με τη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων (Σχήμα 3.4).



**Σχήμα 3. 4.** Τα δύο πιθανά μονοπάτια βιοσύνθεσης των υδροξυβενζοϊκών οξέων μέσω των αντίστοιχων υδροξυκιναμικών ως πρόδρομων (Προσαρμογή από Strack, 1997).

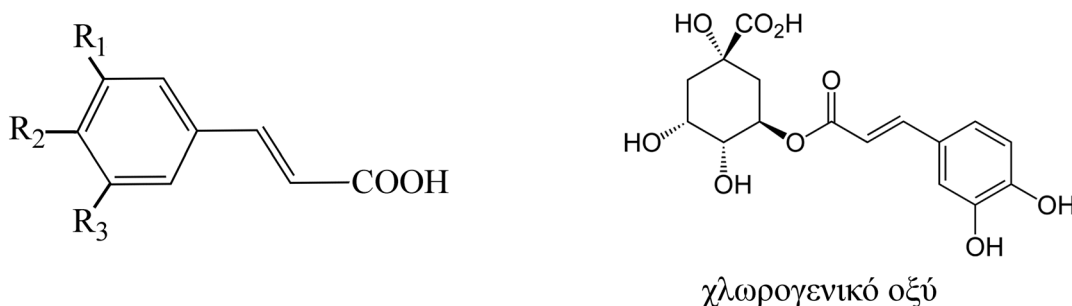
Σε ορισμένες περιπτώσεις τα υδροξυβενζοϊκά μπορούν να παραχθούν από αποδόμηση των φλαβονοειδών (Strack 1997), όπως επίσης από ενδιάμεσα στάδια του ShP (Goodwin and Mercer, 1983; Vermerris and Nicholson, 2008). Συγκεκριμένα το GA και το PC μπορεί να συντεθούν από το 5-αφυδροξυσικιμικό οξύ σε ενδιάμεσο στάδιο του ShP (Σχήμα 3.2). Σύμφωνα με τον Wildermuth (2006), μένει ακόμα να αποσαφηνιστεί σε ποιους ιστούς και κάτω από ποιες συνθήκες τα δύο μονοπάτια (PhP, ShP) χρησιμοποιούνται.

Οι Ishikura et al. (1984), μελέτησαν τη βιοσύνθεση του GA σε φύλλα *Acer buergerianum* και *Rhus succedanea* χρησιμοποιώντας ραδιενεργό σικιμικό οξύ και ραδιενεργή φαινυλαλανίνη για να προσδιορίσουν το μονοπάτι βιοσύνθεσης. Βρήκαν ότι σε νεαρά φύλλα η ενσωμάτωση του σικιμικού στο μόριο του GA και του EL ήταν μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της φαινυλαλανίνης, αντίθετα σε φύλλα μεγαλύτερης ηλικίας βρέθηκε μεγαλύτερη ενσωμάτωση της φαινυλαλανίνης έναντι του σικιμικού. Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξε και ο Saijo (1983), ο οποίος προτείνει ότι στους βλαστούς του τεϊόδενδρου το GA βιοσυντίθεται τουλάχιστον από δύο μονοπάτια, το PhP αλλά και το ShP μέσω αφυδρογόνωσης του σικιμικού οξέως. Συσσώρευση HB βρέθηκε σε καλλιέργειες

κυττάρων *Cocos nucifera* με αυξημένες ενεργότητες ενζύμων (PAL, *p*-κουμαρόυλ-CoA λιγάση, *p*-υδροξυβενζαλδεΐδη αφυδρογονάση) που δραστηριοποιούνται στα πρώτα στάδια του PhP (Chakraborty et al., 2009). Στην παραπάνω έρευνα η εφαρμογή παρεμποδιστών της δράσης των τριών ενζύμων περιόρισαν τη συσσώρευση του HB, υποδηλώνοντας τη βιοσύνθεσή του μέσω του PhP. Στο καρότο, αναφέρεται κατηγορηματικά ότι η βιοσύνθεση του HB είναι CoA-ανεξάρτητη και όχι ανάλογη του μονοπατιού της  $\beta$ -οξειδωσης (Sircar and Mitra, 2009). Σύμφωνα με τους Werner et al. (2004), είναι προφανές ότι τα διάφορα μονοπάτια για τη βιοσύνθεση των βενζοϊκών οξέων μπορεί να συνυπάρχουν ακόμα και στο ίδιο φυτό, με τη ροή από το ένα στο άλλο να ελέγχεται από διάφορους παράγοντες (ορμόνες ή αβιοτική καταπόνηση).

### 3.1.5.2. Κιναμικά οξέα

Τα υδροξυκινναμικά οξέα (C6-C3) είναι ευρέως διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο και τα κυριότερα είναι το *p*-κουμαρικό, το καφεϊκό, το φερουλικό, το χλωρογενικό και το σιναπικό οξύ (Σχήμα 3.5) (Crozier et al., 2009; Goodwin and Mercer, 1983). Τα φαινολικά αυτά απαντώνται κυρίως συζευγμένα (με υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπίδια και φλαβονοειδή) και σπανιότερα ως γλυκοζίτες (Strack, 1997).



Οξύ		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<i>trans</i> -κινναμικό		-	-	-
<i>p</i> -κουμαρικό	4- υδροξυκινναμικό	H	OH	H
καφεϊκό	3,4- διυδροξυκινναμικό	OH	OH	H
φερουλικό	4- υδροξυ-3-μέθοξυκινναμικό	OCH <sub>3</sub>	OH	H
σιναπικό	4- υδροξυ-3,5-μέθοξυκινναμικό	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>

**Σχήμα 3. 5.** Χημική δομή των ευρέως διαδεδομένων υδροξυκινναμικών οξέων (Προσαρμογή από Shahidi and Naczk, 2004).

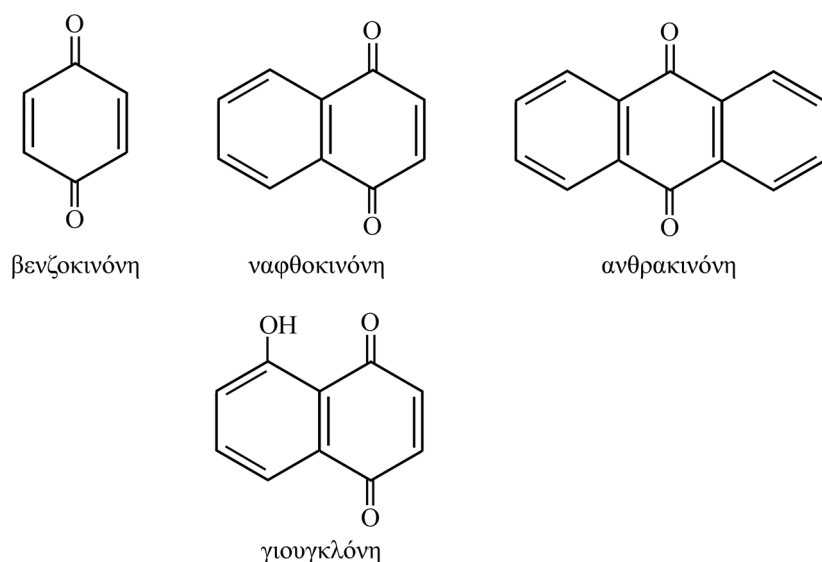
Στην καρδιά κοινά υδροξυκινναμικά οξέα έχουν προσδιοριστεί στο σπέρμα (Colaric et al., 2005) και το περικόρπιο (Cosmulescu et al., 2010; Matok et al., 2009; Stampar et al., 2006). Στο σπέρμα έχουν προσδιοριστεί επίσης ο γλυκοζίτης του φερουλικού και το κουμαροϋλκινονικό οξύ (Gómez-Caravaca et al., 2008), ενώ στα φύλλα έχουν προσδιοριστεί

το *p*-κουμαρικό και το καφεϊκό σε διάφορες μορφές συζευγμένα με κινόνες (Amaral et al., 2004; Pereira et al., 2008).

Τα υδροξυκινναμικά οξέα βιοσυντίθενται κυρίως μέσω του PhP και έχουν ως πρόδρομο το *trans*-κινναμικό (Σχήμα 3.2). Η PAL είναι το βασικό ένζυμο που δρα επί της φαινυλαλανίνης, ώστε να ξεκινήσει η βιοσύνθεση των υδροξυκινναμικών, ωστόσο σε ορισμένα είδη έχει παρατηρηθεί ότι η PAL μπορεί να δράσει και επί της τυροσίνης και να οδηγήσει κατευθείαν στη βιοσύνθεση του *p*-κουμαρικού χωρίς να παρεμβληθεί η βιοσύνθεση του *trans*-κινναμικού (Strack, 1997). Από το *p*-κουμαρικό με μια σειρά υδροξυλιώσεων και μεθυλιώσεων παράγονται τα υπόλοιπα υδροξυκινναμικά. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι τα υδροξυκινναμικά, τουλάχιστον εν μέρει, βιοσυντίθενται από τις αντίστοιχες αλδεΐδες και αλκοόλες παρά από απευθείας υποκατάσταση του δακτυλίου στα ελεύθερα οξέα (Humphreys et al., 1999; Meyermans et al., 2000; Nair et al., 2004; Osakabe et al., 1999).

### 3.1.5.3. Κινόνες

Οι κινόνες (quinones) που απαντώνται κυρίως στους φυτικούς ιστούς είναι οι βενζο-, νάφθο- και ανθρακινόνες (Σχήμα 3.6). Οι βενζοκινόνες δεν απαντώνται συχνά στα φυτικά είδη ωστόσο σε μορφή υδροξυκινονών είναι ευρέως διαδεδομένες, οι ναφθοκινόνες απαντώνται κυρίως ως γλυκοζίτες ενώ περισσότερες από 200 ανθρακινόνες έχουν αναφερθεί σε καλλωπιστικά φυτά (Goodwin and Mercer, 1983).



**Σχήμα 3. 6.** Βασική δομή κινονών και η ναφθοκινόνη γιουγκλόνη που αποτελεί χαρακτηριστικό συστατικό στα διάφορα μέρη της καρδιάς (Προσαρμογή από Strack, 1997).

Στην καρδιά χαρακτηριστικό συστατικό αποτελεί η γιουγκλόνη (5-υδρόξυ-1,4-ναφθοκινόνη) η οποία έχει προσδιοριστεί στο σπέρμα (Colaric et al., 2005), στα φύλλα (Girzu et al., 1998), το περικάρπιο (Buttery et al., 2000; Radix et al., 1998; Stampar et al., 2006) και

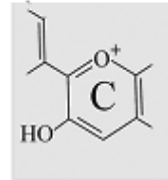
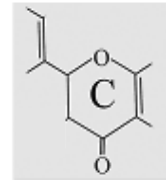
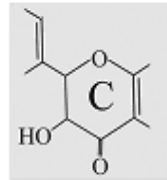
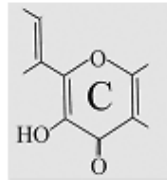
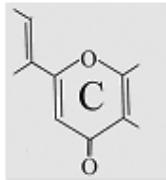
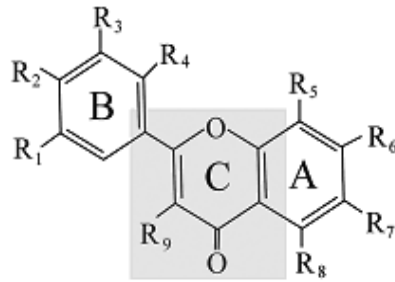
τις ρίζες (Hedin et al., 1979). Επίσης η 1,4-ναφθοκινόνη, η 2-μεθυλ-1,4-ναφθοκινόνη και η 5-υδροξύ-2-μεθυλ-1,4-ναφθοκινόνη έχει αναφερθεί ότι απαντώνται στην καρδιά (Leistner, 1981; Müller and Leistner, 1978).

Οι κινόνες θεωρούνται φαινολικά λόγω της ύπαρξης φαινολομάδας στο μόριο τους, αν και προκύπτουν από διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια σε σχέση με τις άλλες φαινολικές ενώσεις. Στους φυτικούς ιστούς η σύνθεση των κινονών γίνεται κυρίως μέσω ηλεκτρυλβενζοϊκού μονοπατιού (Succinylbenzoate pathway) το οποίο αποτελεί επέκταση του ShP και ξεκινάει με τη μετατροπή του χορισμικού οξέος σε ισοχορισμικό. Δευτερευόντως κινόνες μπορεί να συντεθούν και μέσω του πολυκετιδικού μονοπατιού και το τελικό προϊόν, εξαρτάται από την ανθρακική αλυσίδα της αρχικής μονάδας, τον αριθμό των malony-CoA που εμπλέκονται και την εισαγωγή συγκεκριμένων υποκαταστατών (Strack, 1997).

#### **3.1.5.4. Φλαβονοειδή**

Τα φλαβονοειδή αποτελούν μια πολύ διαδεδομένη κλάση φαινολικών με μεγάλη ποικιλομορφία καθώς πάνω από 5000 φλαβονοειδή είναι γνωστά (Strack, 1997). Είναι C<sub>15</sub> ενώσεις που έχουν τη γενική δομή C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> και χωρίζονται σε επιμέρους ομάδες με βάση τη δομή του κεντρικού πυρανικού δακτυλίου (Σχήμα 3.7).





φλαβόνες

φλαβονόλες

φλαβαν-3-όλες

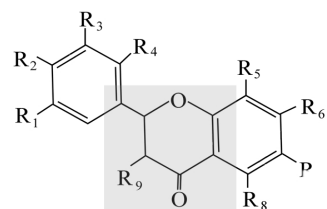
φλαβανόνες

ανθοκυανιδίνες

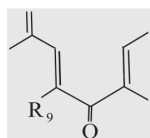
Φλαβονοειδές	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>
<b>Φλαβόνες</b>									-
απιγενίνη	-	-	OH	H	OH	-	-	OH	-
λουτεολίνη	-	-	OH	OH	OH	-	-	OH	-
<b>φλαβονόλες</b>									OH
καμφερόλη	H	H	OH	-	OH	-	-	OH	OH
κερκετίνη	H	OH	OH	-	OH	-	-	OH	OH
μυρικετίνη	H	OCH <sub>3</sub>	OH	-	OH	-	-	OH	OH
ισοραμνετίνη	OH	OH	OH	-	OH	-	-	OH	OH
<b>Φλαβαν-3-όλες</b>									OH
κατεχίνη	-	OH	OH	-	OH	-	-	OH	OH
επικατεχίνη	-	OH	OH	-	OH	-	-	OH	OH
<b>φλαβανόνες</b>									-
εριοδουκτιόλη	H	OH	OH	-	-	-	-	-	-
εσπεριτίνη	H	OCH <sub>3</sub>	OH	-	-	-	-	-	-
ναριγκίνη	H	OH	H	-	-	-	-	-	-
<b>ανθοκυανιδίνες</b>									OH
πετουνιδίνη	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	-	OH	-	-	OH	OH
μαλβιδίνη	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	-	OH	-	-	OH	OH
πελαργονιδίνη	H	OH	H	-	OH	-	-	OH	OH
κυανιδίνη	H	OH	OH	-	OH	-	-	OH	OH
πεονιδίνη	H	OH	OCH <sub>3</sub>	-	OH	-	-	OH	OH
δελφινιδίνη	H	OH	OH	-	OH	-	-	OH	OH

**Σχήμα 3. 7.** Η χημική δομή των διαφόρων κλάσεων των φλαβονοειδών και τα ευρέως διαδεδομένα φλαβονοειδή στα φυτά (Προσαρμογή από Crozier et al., 2009).

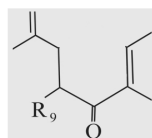
Στην κλάση των φλαβονοειδών έχει επικρατήσει να κατατάσσονται οι χαλκόνες, οι διυδροξυχαλκόνες και οι αυρόνες (δευτερογενή φλαβονοειδή) λόγω των ομοιοτήτων τους με τα υπόλοιπα φλαβονοειδή τόσο από την άποψη της δομής όσο και τη βιοσύνθεση (Goodwin and Mercer, 1983) (Σχήμα 3.8).



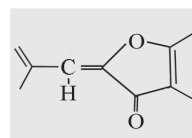
γενική δομή φλαβονοειδών



χαλκόνες



διυδροξυχαλκόνες



αουρόνες

**Σχήμα 3. 8.** Η δομή των δευτερευόντων φλαβονοειδών (Προσαρμογή από Goodwin and Mercer, 1983).

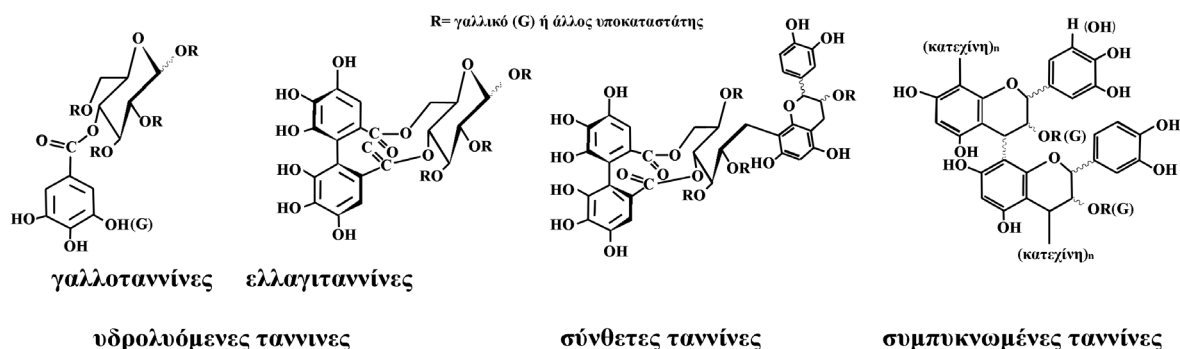
Η βιοσύνθεση των φλαβονοειδών είναι πιο σύνθετη σε σχέση με των άλλων φαινολικών, καθώς οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι (A και B) του μορίου τους προκύπτουν από διαφορετικά μονοπάτια (Goodwin and Mercer, 1983). Το φαινυλπροπανικό τμήμα (δακτύλιος B και C<sub>2,3,4</sub>) προέρχεται από το *p*-κουμαρικό οξύ, ενώ ο δακτύλιος A σχηματίζεται από το οξικό και αποτελεί μάλλον μια ειδική περίπτωση πολυκετιδικής σύνθεσης. Ο πλήρης μηχανισμός βιοσύνθεσης των διαφόρων ομάδων των φλαβονοειδών δεν είναι σαφής. Κατά ένα πιθανό μονοπάτι βιοσύνθεσης, μέσω των χαλκόνων σχηματίζονται οι φλαβονόνες οι οποίες μεταβολίζονται στις υπόλοιπες ομάδες (Σχήμα 3.2) (Strack, 1997). Κατά τη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών συμβαίνει ένας μεγάλος αριθμός δευτερογενών τροποποιήσεων που οδηγεί στις συγκεκριμένες μοριακές δομές. Οι τροποποιήσεις αυτές γίνονται μέσω αντιδράσεων υδροξυλίωσης, *O*-μεθυλίωσης, *O*-γλυκοζιδίωσης, *C*-γλυκοζιδίωσης, *C*-αλκυλίωσης και ενζυμικού πολυμερισμού (Goodwin and Mercer, 1983).

Στα διάφορα φυτικά μέρη της καρυδιάς έχουν ανιχνευτεί φλαβονοειδή που ανήκουν στις ομάδες των φλαβανολών και φλαβαν-3-ολών. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί κατεχίνη και η κερκετίνη σε γλυκοζιτική μορφή στο σπέρμα (Anderson et al., 2001; Gómez-Caravaca et al., 2008) και διάφοροι γλυκοζίτες της κερκετίνης στα φύλλα (Amaral et al., 2004; Pereira et al., 2007). Επίσης, στο περικάρπιο και στους βλαστούς έχουν ταυτοποιηθεί η κατεχίνη, η επικατεχίνη, η μυρικετίνη και η κερκετίνη (Claudot et al., 1997; Cosmulescu et al., 2010; Matok et al., 2009; Radix et al., 1998; Solar et al., 2006; Stampar et al., 2006).

### 3.1.5.5. Ταννίνες

Ως ταννίνες χαρακτηρίζονται φαινολικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους που ενώ έχουν διαφορετική δομή, έχουν όμως μια κοινή ιδιότητα: ενώνονται με τις πρωτεΐνες και άλλα πολυμερή, και προκαλούν την καθίζησή τους (Vermeris and Nicholson, 2008). Οι ταννίνες μπορούν ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες: τις υδρολυόμενες, τις συμπυκνωμένες και

τις σύνθετες ταννίνες (Σχήμα 3.9) (Khanbabaee and van Ree, 2001). Οι υδρολυόμενες ταννίνες αποτελούνται κυρίως από εστέρες του GA και του EL με γλυκόζη και διακρίνονται σε γαλλοταννίνες και ελλαγιταννίνες, αντίστοιχα.



**Σχήμα 3. 9.** Η βασική δομή των ομάδων των ταννινών (Προσαρμογή από Khanbabaee and van Ree, 2001).

Οι συμπυκνωμένες ταννίνες, οι οποίες ονομάζονται και προανθοκυανιδίνες, είναι ολιγομερή ή πολυμερή φλαβαν-3-ολών. Το μέγεθος του μορίου εξαρτάται από το βαθμό πολυμερισμού. Τα μονομερή συνδέονται μέσω C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> δεσμού ή C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> δεσμού, οπότε προκύπτουν προανθοκυανιδίνες τύπου B, ενώ στις αντίστοιχες τύπου A συνδέονται μέσω ενός επιπλέον C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub> αιθερικού δεσμού (Σχήμα 3.9) (Crozier et al., 2009; Francisco and Resurreccion, 2008).

Τα καρύδια θεωρούνται εξαιρετική πηγή ταννινών. Μάλιστα, τα καρύδια παρουσιάζουν τη μικρότερη ευαισθησία, μεταξύ όλων των ξηρών καρπών, στην συσσώρευση αφλατοξινών, γεγονός που έχει αποδοθεί στις ταννίνες τους (Mahoney et al., 2010). Η μελέτη των ταννινών στην καρυδιά καθίσταται εξαιρετικά δύσκολη λόγω της πολύπλοκης δομής τους, ενώ ακόμα πιο δύσκολη είναι η ποσοτικοποίησή τους λόγω της απουσίας προτύπων ουσιών (Fukuda et al., 2003; Sze-Tao et al., 2001). Στα καρύδια, έχουν μελετηθεί τα κλάσματα των ταννινών ως προς την περιεκτικότητά τους σε TP και την TAC τους (Karamač, 2009a; Karamač, 2009b; Mahoney et al., 2010; Sze-Tao et al., 2001). Ενώ έχουν ταυτοποιηθεί οι glansrins A-C, 2,3-*O*-(*S*)-hexahydroxydiphenoyl-d-glucopyranose, isostrictinin, pedunculagin, casuarictin, strictinin, tellimagrandin I, tellimagrandin II, 1,2-di-*O*-galloyl-4,6-*O*-(*S*)-hexahydroxydiphenoyl-b-d-glucopyranose, rugosin C, praecoxin A, casuarinin, stenophyllanin A, stachyuranin B, 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- $\alpha$ -D-glucose, 1,2,4,6-tetra-*O*-galloyl- $\alpha$ -D-glucose, 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\alpha$ -D-glucose, rugosin F, glansreginin A, glansreginin B, glansrin D, gemin D, pterocarinin A, platycaryanin A, euprostin A, 1-desgalloylrugosin F, heterophyllin D (Cerda et al., 2005; Fukuda et al., 2003; Ito et al., 2007).

### 3.1.6. Επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών επί των φαινολικών συστατικών

Η έκθεση των φυτικών ιστών σε χαμηλές θερμοκρασίες μπορεί να συμβεί είτε κατά την παρουσία των φυτών στον αγρό ή ως πρακτική συντήρησης των προϊόντων τους. Η χαμηλή θερμοκρασία, πέρα από τις επιδράσεις επί όλων των λοιπών μεταβολικών διεργασιών, επιδρά και επί του μεταβολισμού των φαινολικών ενώσεων. Οι φαινολικές ουσίες στα φυτά εμπλέκονται στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι βιοτικών ή/και αβιοτικών καταπονήσεων (Dixon and Paiva, 1995), μία από τις οποίες είναι η χαμηλή θερμοκρασία. Αυξήσεις των φαινολικών σε διάφορους φυτικούς ιστούς έχουν παρατηρηθεί σε ένα εύρος χαμηλών θερμοκρασιών, το επίπεδο των οποίων εξαρτάται από το είδος του φυτού ή/και του φυτικού ιστού. Για παράδειγμα, αυξημένα επίπεδα TP έχουν βρεθεί σε μπανάνες συντηρημένες στους 8° C (Chen et al., 2008), σε φύλλα ελιάς σε θερμοκρασίες κοντά στους 0° C (Ortega-García and Peragón, 2009) και σε ελαιοκράμβη εκτεθειμένη σε θερμοκρασίες έως και -5° C (Solecka and Kacperska, 2003).

Η αύξηση των συγκεντρώσεων των φαινολικών από την χαμηλή θερμοκρασία προέρχεται από την επαγωγή του μεταβολισμού των φανυλ-προπανοειδών μέσω επαγωγής της PAL (Tomás-Barberán and Espín, 2001; Wen et al., 2005). Η επαγωγή της PAL μπορεί να συμβαίνει μέσω δραστηριοποίησης ή/και *de novo* σύνθεσής της (Chen et al., 2008; Dixon and Paiva, 1995; Leyva et al., 1995).

Εκτός όμως από την PAL στο μεταβολισμό των φαινολικών εμπλέκεται ένα πλήθος ενζύμων τα οποία καταλύουν είτε τη βιοσύνθεσή ή τον καταβολισμό των ενώσεων αυτών. Δύο ένζυμα, η πολυφαινολοξειδάση (PPO, EC 1.14.18.1) και η υπεροξειδάση (POD, EC 1.11.1.7), εμπλέκονται στην αποδόμηση των φαινολικών συστατικών και επηρεάζουν κυρίως την ποιότητα του προϊόντος, καθώς οδηγούν στην παραγωγή καφέ πολυμερών (μελανίνες) (Manzocco et al., 2001; Tomás-Barberán and Espín, 2001). Αναφέρεται ότι το επίπεδο των φαινολικών στους καρπούς μπορεί να μειωθεί μέσω της άμεσης οξειδωσής τους από την PPO και την POD (Espín and Wichers, 2000; Jiménez and García-Carmona, 1999). Τα δυο αυτά ένζυμα μπορεί να είναι λανθάνοντα και να επάγονται μέσω διαφόρων παραγόντων (Espín et al., 1999a ; Espín and Wichers, 1999b; Hyodo et al., 1991; Ketsa and Atantee, 1998; Roberts et al., 1988). Όσον αφορά την PPO έχει παρατηρηθεί αύξηση της ενεργότητάς της σε καρπούς πολλών ειδών (ανανάς, ροδακινιά, δαμασκηλιά, μαρούλι, μάνγκο) κατά την έκθεσή τους σε χαμηλές θερμοκρασίες (Boo et al., 2011; Jin et al., 2009; Lin et al., 2011; Luo et al., 2011; Zhou et al., 2003). Αντιθέτως, τα αποτελέσματα που αφορούν την επίδραση των χαμηλών θερμοκρασιών συντήρησης επί της ενεργότητας της POD είναι αντικρουόμενα. Συγκεκριμένα υπό την επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών, αυξημένη ενεργότητα της POD βρέθηκε σε μάνγκο και δαμάσκινα (Lin et al., 2011; Luo et al., 2011), μειωμένη σε μαρούλια και ροδάκινα (Boo et al., 2011; Jin et al., 2009), ενώ δεν

παρατηρήθηκαν αλλαγές της ενεργότητας σε ανανά (Zhou et al., 2003). Η αυξημένη ενεργότητα της PPO υπό χαμηλές θερμοκρασίες, δεν συνδέεται πάντα με αύξηση της έκφρασης των γονιδίων της (Raimbault et al., 2011), καθώς στην μπανάνα και το σπανάκι η αυξημένη ενεργότητα της PPO αποδόθηκε κυρίως στην ενέργοποίηση του λανθάνοντος ενζύμου (Gooding et al., 2001; Lieberei et al., 1981). Αντίθετα, στον ανανά οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην δραστηριοποίηση των PPO και POD υπό την επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών είναι αποτέλεσμα της *de novo* σύνθεσης της PPO, αλλά όχι της POD (Raimbault et al., 2011). Όσον αφορά την POD η έκφραση και σύνθεσή της επάγεται υπό ένα πλήθος αβιοτικών καταπονήσεων (αλατότητα, ορμόνες, τραυματισμός, υπεροξείδιο του υδρογόνου) (Gao et al., 2010; Kim et al., 2000; Park et al., 2003), συμπεριλαμβανομένων και των χαμηλών θερμοκρασιών (Huh et al., 1997).

### **3.1.7. Σκοπός κεφαλαίου**

Σκοπός του παρόντος κεφαλαίου ήταν η μελέτη της συντήρησης των νωπών καρυδιών, καθώς στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν στοιχεία. Επιλέχθηκε να επικεντρωθεί η συντήρηση σε θερμοκρασία 1° C, δεδομένου ότι οι καρποί ακροδρύων ειδών έχουν βρεθεί να ανέχονται χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης (Cecchini et al., 2011; Jermini et al., 2006; Mencarelli et al., 1982; Moschetti et al., 2012; Rouves and Prunet, 2002) ενώ παράλληλα θεωρούνται πολύ ευπαθείς μετά τη συγκομιδή.

Για τα νωπά καρύδια δεν υπάρχουν καθόλου στοιχεία σχετικά με τη φυσιολογία των σπερμάτων τους και για το λόγο αυτό μελετήθηκαν ορισμένα φυσιολογικά χαρακτηριστικά (αναπνοή, έκλυση αιθυλενίου) τα οποία αποτελούν σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν τη συντήρηση των καρπών. Εκτός από το χρώμα του σπέρματος που αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό ποιότητας με βάση την αντίληψη του καταναλωτή, δόθηκε έμφαση στα φαινολικά συστατικά. Παρόλο, που τα φαινολικά είναι από τα σημαντικότερα συστατικά των καρυδιών που τα καθιστούν από τα κορυφαία της λίστας των φυτικών προϊόντων, ελάχιστα στοιχεία είναι διαθέσιμα σχετικά με το μεταβολισμό τους στα σπέρματα. Για τον παραπάνω λόγο εκτός από τις αλλαγές των φαινολικών (ολικών και μεμονωμένων) μελετήθηκαν και βασικά ένζυμα του μεταβολισμού των φαινυλ-προπανοειδών (PAL, PPO, POD).

## **3.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

---

### **3.2.1. Φυτικό υλικό**

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για το παρόν πειραματικό μέρος προήλθε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1 του δευτέρου κεφαλαίου.

### **3.2.2. Αποφλοιώση-διαλογή καρπών**

Οι καρποί που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πειραματικό μέρος δεν είχαν υποστεί αποξήρανση. Η αποφλοιώση και η διαλογή των καρπών έγινε με τον τρόπο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.2 του δευτέρου κεφαλαίου.

### **3.2.3. Πειραματικό σχέδιο και χαρακτηριστικά των καρπών που αξιολογήθηκαν**

Το πειραματικό μέρος περιελάμβανε συντήρηση μη-αποξηραμένων (φρέσκων, νωπών) σπερμάτων καρυδιών με- ή χωρίς-κέλυφος για διάστημα έως 40 ημέρες. Τα σπέρματα με-κέλυφος αποτελούν το ολόκληρο ενδοκάρπιο (OE) του καρυδιού. Η μελέτη της μετά-συλλεκτικής συμπεριφοράς των σπερμάτων και των OE διενεργήθηκε σε τέσσερις πειραματικές περιόδους. Συγκεκριμένα:

Στο Πείραμα Α, εξετάσθηκε η επίδραση της ποικιλίας (τέσσερα επίπεδα: Chandler, Franquette, Hartley, Ιόλη), του χρόνου (τρία επίπεδα: 0, 20, 40 d), και του τρόπου συντήρησης (δύο επίπεδα: με ή χωρίς το κέλυφος) κατά τη συντήρηση των καρυδιών σε θερμοκρασία 1° C. Εξετάσθηκε το βάρος, η σκληρότητα του κελύφους, η αναπνοή και η έκλυση αιθυλενίου των OE. Παράλληλα, μελετήθηκαν το βάρος, το χρώμα, η αναπνοή, η έκλυση αιθυλενίου, τα ολικά φαινολικά (TP) και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) του σπέρματος συντηρημένα με- ή χωρίς-κέλυφος.

Στο Πείραμα Β, μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου συντήρησης (τρία επίπεδα: 0, 10, 20 d) και της αποξήρανσης (δύο επίπεδα: νωπά, αποξηραμένα σπέρματα) κατά την συντήρηση νωπών OE. Εξετάσθηκαν η περιεκτικότητα σε υγρασία και τα TP των σπερμάτων.

Το Πείραμα Γ περιελάμβανε δύο μέρη. Στο πρώτο μέρος μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου συντήρησης (επτά επίπεδα: 0, 1, 4, 7, 10, 20, 30 d) και της θερμοκρασίας (δύο επίπεδα: 1° C, 8° C) κατά τη συντήρηση σπερμάτων της ποικιλίας Franquette στο χρώμα, τα TP, την TAC και τα μεμονωμένα φαινολικά. Στο δεύτερο μέρος εξετάσθηκε η επίδραση του χρόνου συντήρησης (τέσσερα επίπεδα: 0, 10, 20, 30 d) της θερμοκρασίας (δύο επίπεδα: 1° C, 8° C) και της ουσίας εμπόδισης (πέντε επίπεδα: Μάρτυρας, 2-Aminoindane-2-phosphonic acid, Actinomycin D, Cordycepin, Cycloheximide) κατά τη συντήρηση σπερμάτων της ποικιλίας Franquette επί των TP.

Στο Πείραμα Δ, μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου συντήρησης (δύο επίπεδα: 0, 20 d) και του χειρισμού εμβάπτισης στις ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στο Πείραμα Γ (11 επίπεδα: Μάρτυρας, 2-Aminoindane-2-phosphonic acid, Actinomycin D, Cordycepin, Cycloheximide και τους συνδυασμούς τους ανά δύο) κατά τη συντήρηση σπερμάτων της ποικιλίας Franquette στον 1° C, επί των ολικών και μεμονωμένων φαινολικών, καθώς και της ενεργότητας (ειδική και ολική) των ενζύμων: phenylalanine ammonia-lyase (PAL), polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POD).

Το πρώτο επίπεδο στο παράγοντα του χρόνου συντήρησης (0 d) αντιστοιχεί στα χαρακτηριστικά των καρυδιών κατά τη συγκομιδή. Τα πειράματα σχεδιάστηκαν ως παραγοντικά κατά το εντελώς τυχαίοποιημένο σχέδιο (Καλτσίκης, 1989). Για κάθε συνδυασμό των παραγόντων και των επιπέδων τους χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις επαναλήψεις ( $n = 4$ ).

### **3.2.4. Πειραματικές επεμβάσεις και συντήρηση**

#### **Πείραμα Α**

Μετά την διαλογή, στα μισά ΟΕ από κάθε ποικιλία αφαιρέθηκε πολύ προσεκτικά το κέλυφος ώστε το σπέρμα να παραμείνει ολόκληρο και κατά το δυνατό ανέπαφο. Κατόπιν οι καρποί χωρίστηκαν σε ομάδες (επαναλήψεις) των 10 ΟΕ (σπέρματα με-κέλυφος) ή 10 σπερμάτων χωρίς-κέλυφος και τοποθετήθηκαν θάλαμο συντήρησης με συνθήκες 1° C και 90% R.H όπου συντηρήθηκαν για χρονικό διάστημα έως και 40 d. Δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν μετά από 0, 20, 40 d για την εκτίμηση των χαρακτηριστικών των καρπών.

#### **Πείραμα Β**

Μετά την διαλογή, τα ΟΕ από κάθε ποικιλία (Chandler, Franquette, Hartley, Ιόλη) χωρίστηκαν σε δύο ομάδες (Α και Β) και τοποθετήθηκαν θάλαμο συντήρησης με συνθήκες 1° C και 90% R.H όπου παρέμειναν για χρονικό διάστημα έως και 20 d. Δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν μετά από 0, 10, 20 d. Σε κάθε δειγματοληψία, στα ΟΕ της ομάδας Α αφαιρέθηκε το κέλυφος και έγινε λήψη του νωπού σπέρματος. Τα ΟΕ της ομάδας Β αποξηράνθηκαν στους 36° C για 24 h και κατόπιν αφαιρέθηκε το κέλυφος ώστε να γίνει η λήψη του αποξηραμένου σπέρματος.

#### **Πείραμα Γ**

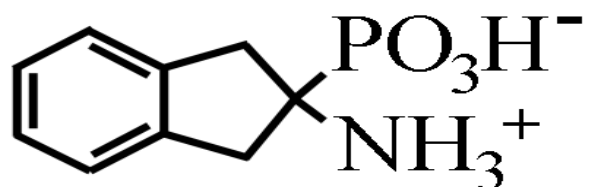
Στο Πείραμα Γ μελετήθηκαν καρποί της ποικιλίας Franquette. Μετά τη διαλογή αφαιρέθηκε το κέλυφος και το σπέρμα διαιρέθηκε σε τέσσερα τμήματα. Αρχικά το σπέρμα διαιρέθηκε στα δύο ημισπέρμια και κατόπιν το κάθε ημισπέρμιο διαιρέθηκε σε δύο μέρη. Με

τον τρόπο αυτόν από κάθε σπέρμα προέκυψαν τέσσερα όμοια τμήματα, καθώς το επίπεδο που οριοθετείται από τη ραφή του κελύφους διαιρεί το σπέρμα σε δύο συμμετρικά μέρη (ημισπέρμια) και το επίπεδο κάθετα στο επίπεδο της ραφής του κελύφους διαιρεί το κάθε ημισπέρμιο σε δύο επίσης συμμετρικά μέρη (τέταρτα). Τα τέταρτα του σπέρματος ενώνονται μεταξύ τους σε μια ζώνη με μήκος και πλάτος το 1:5 περίπου του μήκους και του πλάτους του σπέρματος, αντίστοιχα.

Μετά τη διαίρεση των σπερμάτων ακολούθησε η εμφάνιση των τετάρτων στα διαλύματα (όγκου 1 l) των ουσιών που αποτέλεσαν τις επεμβάσεις. Ο χρόνος εμφάνισης ήταν 30 min καθώς η διάρκεια αυτή, κατόπιν δοκιμής με χρωστική ουσία, ήταν η απαιτούμενη ώστε να μετακινηθεί μια ουσία σε όλο το μήκος και πλάτος του σπέρματος. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν σπέρματα που εμφάνιστηκαν σε διπλά απεσταγμένο νερό (DDW). Οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

### **2-Aminoindane-2-phosphonic acid (AIP):**

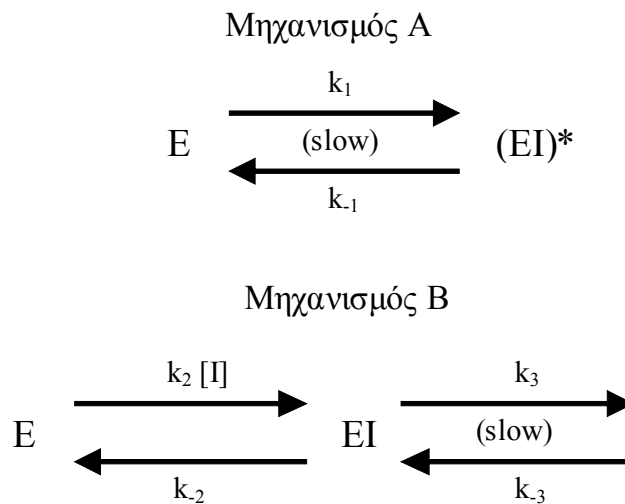
Η AIP (Σχήμα 3.10) είναι παρεμποδιστής της δράσης του ενζύμου φαινυλαλανίνη αμμωνία-λυάση (PAL, phenylalanine ammonia-lyase, EC 4.3.1.24). Η AIP είναι παράγωγο της φαινυλαλανίνης (Janas et al., 1998) με παρεμποδιστική δράση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Zon and Amrhein, 1992). Η δράση της AIP στην παρεμπόδιση της PAL οφείλεται στην αμινομάδα, τη φωσφονική ομάδα καθώς και τη ρίζα του βενζολίου στο σκελετό του ινδάνιου (Zon and Amrhein, 1992). Υπάρχουν δύο πιθανοί μηχανισμοί δράσης (Σχήμα 3.11) της AIP επί της PAL (Appert et al., 2003).



**Σχήμα 3. 10.** 2-Aminoindane-2-phosphonic acid ή AIP (Προσαρμογή από Zon et al., 2004).

Στο μηχανισμό (A), η δέσμευση της AIP επί του μορίου της PAL είναι αργή και παράγεται αμέσως το τελικό σύμπλοκο PAL-AIP (EI)\*. Στο μηχανισμό (B), ένα ενδιάμεσο σύμπλοκο (EI) σχηματίζεται γρήγορα το οποίο υποβάλλεται σε αργή σύσφιξη (tightening) ή ισομερίωση, ώστε να δημιουργηθεί το τελικό σύμπλοκο (EI)\*.



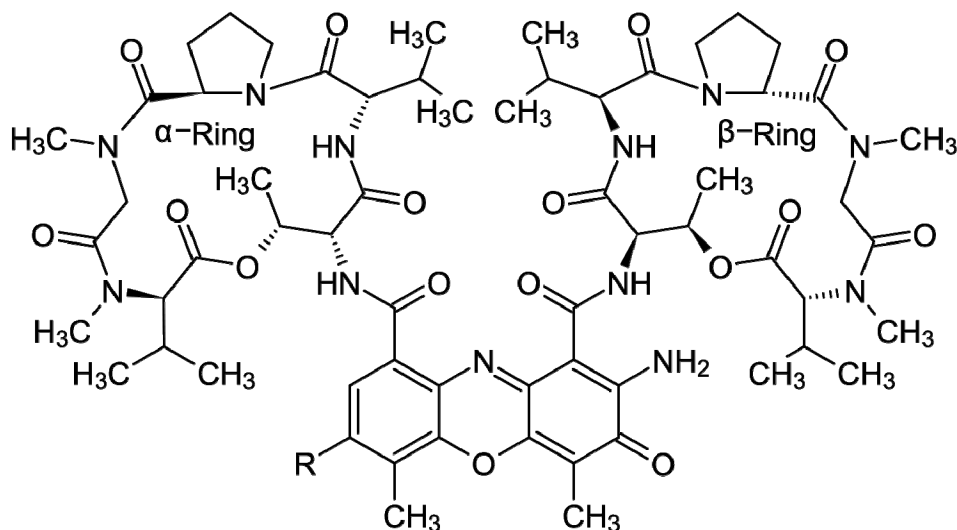


**Σχήμα 3. 11.** Οι δύο πιθανοί μηχανισμοί της παρεμποδιστικής δράσης της AIP επί της PAL (Προσαρμογή από Appert et al., 2003).

Στο Πείραμα Γ η εμβάπτιση των σπερμάτων έγινε σε διάλυμα AIP 112  $\mu\text{M}$ .

### Actinomycin D (ACT)

Η Actinomycin D (ACT) είναι ένα κυκλικό πολυπεπτίδιο (Σχήμα 3.12) που παρεμποδίζει την έκφραση των γονιδίων (gene expression) δρώντας κατά το στάδιο της μεταγραφής (transcription) (Sobell, 1985). Η παρεμποδιστική δράση της ACT οφείλεται στη σύνδεση της στο μόριο του DNA κατά το αρχικό στάδιο του σχηματισμού του συμπλόκου της μεταγραφής και έτσι παρεμποδίζεται η επιμήκυνση από την RNA πολυμεράση (Hori and Watanabe, 2008; Sobell, 1985).

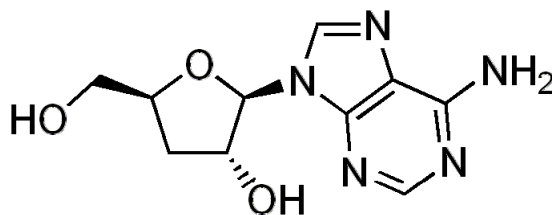


**Σχήμα 3. 12.** Actinomycin D.

Στο Πείραμα Γ η εμβάπτιση των σπερμάτων έγινε σε διάλυμα ACT 16  $\mu\text{M}$ .

### Cordycepin (COR)

Η Cordycepin (Σχήμα 3.13) ή 3'-δεοξυαδενοσίνη (3'-deoxyadenosin) είναι παράγωγο της αδενοσίνης από την οποία διαφέρει λόγω της απουσίας ενός οξυγόνου (O) από την 3' θέση της ριβόζης (Siev et al., 1969).



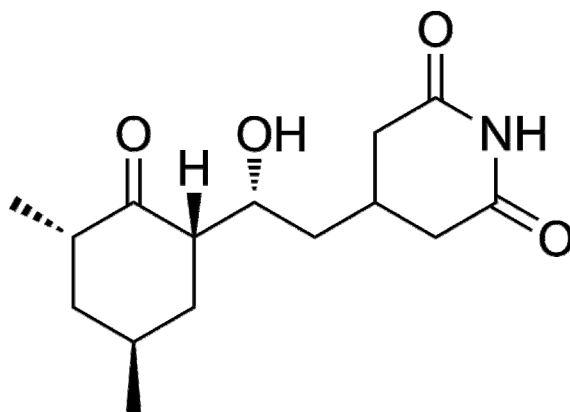
Σχήμα 3. 13. Cordycepin ή 3'-deoxyadenosin.

Η COR λόγω της παρόμοιας δομής της με την αδενοσίνη δεν αναγνωρίζεται από ορισμένα ένζυμα και έτσι μπορεί να συμμετέχει σε ορισμένες βιοχημικές αντιδράσεις (Siev et al., 1969). Εντός του κυττάρου η COR μετατρέπεται σε ένα θειοφωσφορικό ανάλογο, ενσωματώνεται στο μόριο του νέου RNA που συντίθεται έτσι ώστε να παρεμποδίζεται ο σχηματισμός του φωσφοροδιεστερικού δεσμού και να προκαλείται η πρόωρη διακοπή της σύνθεσης του RNA (Hori and Watanabe, 2008).

Στο Πείραμα Γ η εμφάνιση των σπερμάτων έγινε σε διάλυμα COR 100 μΜ.

### Cycloheximide (CHX)

Η Cycloheximide (CHX) (Σχήμα 3.14) είναι ένας παρεμποδιστής της σύνθεσης πρωτεϊνών που δρα στο στάδιο της μετάφρασης (Hori and Watanabe, 2008) επεμβαίνοντας επί της δραστηριότητας της πεπτιδυλικής τρανσφεράρης (peptidyl transferase) της ριβοσωματικής υπό-μονάδας 60S (Hori and Watanabe, 2008).



Σχήμα 3. 14. Cycloheximide (Προσαρμογή από Schneider-Poetsch et al., 2010).

Στο Πείραμα Γ η εμφάνιση των σπερμάτων έγινε σε διάλυμα CHX 500 μΜ.

## **Πείραμα Δ**

Στο Πείραμα Δ μελετήθηκαν καρποί της ποικιλίας Franquette. Μετά τη διαλογή αφαιρέθηκε το κέλυφος, το σπέρμα διαιρέθηκε σε τέσσερα τμήματα και ακολούθησε η εμβάπτιση των τετάρτων στα διαλύματα (όγκου 1 l) των ουσιών που αποτέλεσαν τις επεμβάσεις όπως περιγράφεται στο Πείραμα Γ. Στο Πείραμα Δ οι επεμβάσεις ήταν: 16 μM ACT, 112 μM AIP, 100 μM COR και 500 μM CHX καθώς και οι συνδυασμοί των ουσιών αυτών ανά δύο ACT+AIP, ACT+COR, ACT+CHX, AIP+COR, AIP+CHX, COR+CHX. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν σπέρματα που εμβάπτιστηκαν σε DDW.

### ***3.2.5. Μετρήσεις ποιοτικών-καρπολογικών χαρακτηριστικών***

#### ***3.2.5.1. Μέγεθος, σκληρότητα κελύφους, ποσοστό σπέρματος***

Το μέγεθος του καρπού προσδιορίστηκε πριν τη συντήρηση (0 d) μετρώντας με ηλεκτρονικό βερνιέρο ακρίβειας δεκάτου του χιλιοστού το μήκος (mm) και τη διαμέτρο (mm) του ενδοκαρπίου (IPGRI, 1994). Συγκεκριμένα ως μήκος λήφθηκε η μέγιστη απόσταση δύο σημείων επί του επιπέδου που ορίζεται από την κατά μήκος ραφή του ενδοκαρπίου και ως διάμετρος λήφθηκε η μέγιστη απόσταση δύο σημείων μεταξύ των δύο ημισφαιρίων που διαχωρίζονται από την κατά μήκος ραφή του ενδοκαρπίου.

Η σκληρότητα του κελύφους προσδιορίστηκε με βάση την δύναμη (N) που απαιτείται ώστε να σπάσει το κέλυφος. Για τη μέτρηση χρησιμοποιήθηκε επιτραπέζιο πενετρόμετρο Chatillon DF1S 50 (J. Chatillon and Sons Inc., NY, USA), εφοδιασμένο με κινητή πλάκα διαμέτρου 2 cm. Η ταχύτητα καθόδου της πλάκας ήταν  $50 \text{ mm min}^{-1}$  και η δύναμη ασκήθηκε σε επίπεδο κάθετο στο επίπεδο της κατά μήκος ραφής. Η σκληρότητα του ενδοκαρπίου προσδιορίστηκε σε τρεις δειγματοληψίες μετά από 0, 20 και 40 d συντήρησης.

Το ποσοστό του σπέρματος υπολογίστηκε πριν τη συντήρηση (0 d) με βάση το βάρος του ΟΕ και του βάρους του σπέρματος μετά την απομάκρυνση του κελύφους. Ως ποσοστό σπέρματος του καρυδιού ορίστηκε το βάρος του σπέρματος ανά μονάδα βάρους ολόκληρου του ενδοκαρπίου % (w/w).

#### ***3.2.5.2. Υγρασία και ελαιοπεριεκτικότητα σπέρματος***

Η μέτρηση της υγρασίας και της ελαιοπεριεκτικότητας του σπέρματος έγινε με τον τρόπο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.5.1 του δευτέρου κεφαλαίου.

#### ***3.2.5.3. Χρώμα σπέρματος***

Η μέτρηση του χρώματος του σπέρματος έγινε με τον τρόπο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.5.5.2 του δευτέρου κεφαλαίου.

### **3.2.6. Αναπνοή και έκλυση αιθυλενίου**

Η εκτίμηση της αναπνοής των καρυδιών έγινε μέσω της μέτρησης του εκλυόμενου διοξειδίου του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) (Tsantili et al., 2002). Το παραγόμενο CO<sub>2</sub> από τους καρπούς μετρήθηκε σε ένα κλειστό σύστημα αέριο-χρωματογραφίας (Li-6200, LI-COR, Lincoln, NE, USA) με αναλυτή υπέρυθρων (IRGA, Infrared Gas Analyzer) στο οποίο προσαρμόστηκε αεροστεγής φιάλη όγκου 750 ml. Η ροή του αέρα στο όργανο ήταν 900 μmol s<sup>-1</sup>. Οι καρποί τοποθετήθηκαν στη φιάλη και η μέτρηση του ρυθμού έκλυσης του CO<sub>2</sub> έγινε σε τέσσερις χρόνους ανά 10 s<sup>-1</sup>. Με βάση τον μετρούμενο ρυθμό έκλυσης (DC DT<sup>-1</sup>) του CO<sub>2</sub> η αναπνοή των καρπών εκφράστηκε ως εκλυόμενα μmol CO<sub>2</sub>, ανά κιλό καρπών και ανά ώρα (mmol kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Η μέτρηση της αναπνοής γινόταν σε θερμοκρασία 20° C και οι καρποί, πριν τοποθετηθούν στη φιάλη, είχαν παραμείνει στην ίδια θερμοκρασία για δύο ώρες ώστε να αποκτήσουν τη ίδια θερμοκρασία.

Ο προσδιορισμός του εκλυόμενου, από τους καρπούς, αιθυλενίου (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) έγινε με τη μέθοδο της αέριου-χρωματογραφίας σύμφωνα με τη μέθοδο των Tsantili et al. (2002). Χρησιμοποιήθηκε ο χρωματογράφος Sigma 300 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID, Flame Ionization Detector) και στήλη alumina (Restek, Bellefonte, PA, USADB-23, J & W Scientific, UK) διαστάσεων 120 cm μήκος × 0,2 cm i.d., 80-100mesh. Το όριο ανίχνευσης του οργάνου ήταν 0,416 pmol ml<sup>-1</sup>. Για την πραγματοποίηση της μέτρησης οι καρποί κλείστηκαν σε αεροστεγώς σφραγιζόμενη γυάλινη φιάλη όγκου 500 ml και επώαστηκαν για διάστημα έως 4 h στους 20° C. Για τον προσδιορισμό του C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> έγινε λήψη 1 ml δείγματος από την ατμόσφαιρα της φιάλης κάθε 1 h και έγχυση του στον χρωματογράφο. Η συγκέντρωση του C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> στην ατμόσφαιρα της φιάλης υπολογίστηκε με βάση πρότυπο δείγμα C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> συγκέντρωσης 41,6 pmol ml<sup>-1</sup>. Η έκλυση C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> από τους καρπούς εκφράστηκε σε nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, ανά κιλό καρπών, ανά ώρα (nmol kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>).

Η μέτρηση της αναπνοής και του C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> πραγματοποιήθηκε στο Πείραμα Α σε ΟΕ και σε σπέρματα.

### **3.2.7. Εκτίμηση αντιοξειδωτικών ουσιών των καρπών**

#### **3.2.7.1. Εκχύλιση αντιοξειδωτικών ουσιών**

Η εκχύλιση των αντιοξειδωτικών ουσιών από τα σπέρματα πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6.1 του δευτέρου κεφαλαίου.

#### **3.2.7.2. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών**

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών (TP) πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6.2 του δευτέρου κεφαλαίου.

### **3.2.7.3. Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας**

Ο προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6.3 του δευτέρου κεφαλαίου.

### **3.2.7.4. Μέτρηση φαινολικών συστατικών με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)**

#### **Πείραμα Γ**

Στο Πείραμα Γ, η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών στα σπέρματα της καρυδιάς έγινε με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Το σύστημα HPLC αποτελούνταν από αντλία (Varian 9010, Varian, Santa Clara, USA), ανιχνευτή διάταξης διόδων (diode-array detector, DAD) (HP 1050, Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) και σύστημα επεξεργασίας δεδομένων (ChemStation B.01.03). Ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος έγινε σε στήλη Waters Spherisorb<sup>®</sup> 5 μm ODS-2, 4,6 mm × 250 mm (Waters, Milford, USA) σε θερμοκρασία δωματίου. Η κινητή φάση αποτελούνταν από 2,15 % (v/v) οξικό οξύ σε DDW (διαλύτης A) and MeOH (διαλύτης B). Το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης ήταν: 100% A 0 min, 5% B 0-15 min, 30% B 15-80 min, 35% B 80-95 min, 45% B 95-100 min, 50% B 100-105 min, 100% A 105-115 min. Η ροή της κινητής φάσης ήταν 1 ml min<sup>-1</sup> και ο όγκος έγχυσης του δείγματος 20 μl. Η ταυτοποίηση του κάθε συστατικού έγινε κατόπιν σύγκρισης των κορυφών του δείγματος με πρότυπες φαινολικές ουσίες. Η σύγκριση βασίστηκε στο χρόνο έκλουσης, το φάσμα UV και την αναλογική αύξηση της κορυφής μετά την προσθήκη γνωστής ποσότητας πρότυπης ουσίας στο δείγμα. Προσδιορίστηκαν τα φαινολικά οξέα 4-υδροξυβενζοϊκό (4-hydroxybenzoic, HB, λ<sub>max</sub> = 260 nm), 2,4-διυδροξυβενζοϊκό (dihydroxybenzoic, DHB, λ<sub>max</sub> = 260, 290 nm), πρωτοκατεχικό (protocatechuic, PC, λ<sub>max</sub> = 260, 290 nm), συριγγικό (syringic, SY, λ<sub>max</sub> = 290 nm), βανιλλικό (vanillic, VA, λ<sub>max</sub> = 260, 290 nm), ελλαγικό (ellagic, EL, λ<sub>max</sub> = 260, 290, 360 nm), και ο αιθυλεστέρας του πρωτοκατεχικού (protocatechuic ethyl ester, PCE, λ<sub>max</sub> = 260, 290nm).

#### **Πείραμα Δ**

Λόγω της έλλειψης δεδομένων σχετικά με τα συγκεκριμένα μεμονωμένα φαινολικά του σπέρματος των καρυδιών, στο Πείραμα Δ έγιναν ορισμένες τροποποιήσεις ώστε να γίνει δυνατή η ταυτοποίηση των ουσιών με τη χρήση φασματοσκοπίας μαζών. Στο εκχύλισμα που προέκυψε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.7.1 εφαρμόστηκε εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) με τη χρήση στηλών Isolute<sup>®</sup> C18 (Biotage AB, Uppsala, Sweden) όγκου 10 ml και 200 mg προσροφητή (octadecyl functionalized silica). Κατά τη

διαδικασία γινόταν ενεργοποίηση της στήλης διαδοχικά με DDW και MeOH (1 ml ο κάθε διαλύτης με ροή  $\sim 1 \text{ ml min}^{-1}$ ). Στη συνέχεια 1 ml δείγματος (10% MeOH σε DDW) διαβιβάστηκε μέσω της στήλης με ροή  $\sim 1 \text{ ml min}^{-1}$  και ακολούθως έγινε έκλυση με 1 ml DDW (pH = 2, οξυνισμένο με HCl). Ακολούθησε έκλυση του κλάσματος των φαινολικών με 2 ml MeOH (ροή  $\sim 1 \text{ ml min}^{-1}$ ). Πριν την έγχυση του δείγματος στον χρωματογράφο έγινε απομάκρυνση της MeOH (υπό ροή  $\text{N}_2$  στους  $38^\circ \text{C}$ ) και επαναδιάλυση σε 10% MeOH σε DDW.

Η ταυτοποίηση των φαινολικών συστατικών στα σπέρματα της καρδιάς έγινε σε σύστημα HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) αποτελούμενο από αντλία (Shimadzu LC-10AD VP), ανιχνευτές DAD (SPD-M10 AVP) και φασμάτων μαζών (Shimadzu LC/MS-2010A). Ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος έγινε σε στήλη Ascentis<sup>®</sup> Express 2,7  $\mu\text{m}$  fuse-core, 2,1 mm  $\times$  10 mm (Supelco Analytical, Bellefonte, USA). Η κινητή φάση αποτελούνταν από 2.15 % (v/v) οξικό οξύ σε DDW (διαλύτης A) and MeOH (διαλύτης B). Το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης ήταν: 100% A 0-4 min, 8% B 4-8 min, 11% B 8-20 min, 35% B 20-50 min, 70% B 50-55 min, 90% B 55-60 min, 100% B 60-65 min, 100% A 65-75 min. Η ροή της κινητής φάσης ήταν  $0,15 \text{ ml min}^{-1}$  και ο όγκος έγχυσης του δείγματος 10  $\mu\text{l}$ . Η ανίχνευση στο MS έγινε με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού (Electrospray ionization, ESI) σε αρνητική λειτουργία (negative mode). Αναλυτικά οι συνθήκες του ανιχνευτή MS παρουσιάζονται στο Παράρτημα III. Η ταυτοποίηση του κάθε συστατικού έγινε κατόπιν σύγκρισης των κορυφών του δείγματος με πρότυπες φαινολικές ουσίες. Η σύγκριση βασίστηκε στο χρόνο έκλυσης και τα φάσματα UV και MS. Προσδιορίστηκαν τα φαινολικά HB ( $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$ ;  $[\text{M-H}]^- = 137$ ), DHB ( $\lambda_{\text{max}} = 260, 290 \text{ nm}$ ;  $[\text{M-H}]^- = 153$ ), PC ( $\lambda_{\text{max}} = 260, 290 \text{ nm}$ ;  $[\text{M-H}]^- = 153$ ), SY ( $\lambda_{\text{max}} = 290 \text{ nm}$ ;  $[\text{M-H}]^- = 197$ ), VA ( $\lambda_{\text{max}} = 260, 290 \text{ nm}$ ;  $[\text{M-H}]^- = 167$ ), EL ( $\lambda_{\text{max}} = 260, 290, 360 \text{ nm}$ ;  $[\text{M-H}]^- = 301$ ), και PCE ( $\lambda_{\text{max}} = 260, 290 \text{ nm}$ ;  $[\text{M-H}]^- = 181$ ). Τα φάσματα UV και MS των φαινολικών ουσιών παρατίθενται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III.

Η ποσοτικοποίηση των μεμονωμένων φαινολικών έγινε σε σύστημα HPLC αποτελούμενο από αντλία (Varian 9010, Varian, Santa Clara, USA), ανιχνευτή UV (HP 1050, Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) σύστημα επεξεργασίας δεδομένων (Peak Simple 3.25). Η ανάλυση έγινε με έγχυση 20  $\mu\text{l}$  δείγματος στην ίδια στήλη και με το ίδιο πρόγραμμα έκλυσης που αναφέρεται παραπάνω στην περίπτωση της ανάλυσης HPLC/MS.

### **3.2.8. Μετρήσεις ενζυμικών παραμέτρων**

#### **3.2.8.1. Εκχύλιση και προσδιορισμός ενεργότητας της PAL**

Η εκχύλιση του ενζύμου PAL και ο προσδιορισμός της ενεργότητας του βασίστηκε σε συγκριτική εξέταση διαφόρων μεθόδων (Lichanporn et al., 2009; Liu et al., 2005; Morelló et al., 2005; Ortega-García and Peragón, 2009; Yingsanga et al., 2008).

Κατά την εκχύλιση της PAL, 2 g κονιορτοποιημένου (σε υγρό άζωτο) σπέρματος εκχυλίστηκαν με 10 ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος 0,05 M (pH = 6,6), το οποίο περιείχε 5 mM β-μερκαπτοαιθανόλη (β-mercaptoethanol), 1% PVPP (w/v) (polyvinylpolypyrrolidone) και 0,05% Triton X-114 (w/v). Το μείγμα ομογενοποιήθηκε σε συσκευή Ultra-Turrax για 40 s (13500 rpm). Στη συνέχεια το ομογενοποιημένο δείγμα μεταφέρθηκε σε σφραγιζόμενο φιαλίδιο φυγοκέντρου, διηθούμενο μέσω διηθητικού υφάσματος, και ακολούθησε φυγοκέντριση στα 20.000 g για 20 min στους 4° C. Τέλος γινόταν λήψη της υπερκείμενης φάσης, εκχύλισμα στο οποίο γινόταν η μέτρηση της ενεργότητας της PAL και της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών. Όλη η διαδικασία της εκχύλισης έγινε σε θερμοκρασία 4° C.

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της PAL, 0,2 ml εκχυλίσματος προστέθηκαν σε 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος βορικού οξέως 0,2 M (pH = 8,8). Ακολούθησε προσθήκη 1 ml διαλύματος φαινυλαλανίνης 0,02 M (*L*-phenylalanine) και έγινε επώαση στους 37° C για 30 min. Τέλος έγινε προσθήκη 0,5 ml HCl (6 M) και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 290 nm. Για τον υπολογισμό της ενεργότητας της PAL χρησιμοποιήθηκε η διαφορά της απορρόφησης του δείγματος σε σχέση με τυφλό δείγμα. Η παρασκευή του τυφλού έγινε με την ίδια διαδικασία που περιγράφεται για το δείγμα αλλά με προσθήκη 1 ml 0,00 M φαινυλαλανίνης. Μία μονάδα (Unit) ενεργότητας της PAL θεωρήθηκε η μεταβολή της απορρόφησης για την κατάλυση και παραγωγή 1 μmol κινναμικού οξέως. Για τις παραπάνω αναγωγές προσδιορίστηκε ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης (molar extinction coefficient) του κινναμικού οξέως υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες της μέτρησης (σε ρυθμιστικό διάλυμα, 1 cm πλάτος κυβέτας, στους 37° C). Η τιμή του συντελεστή μοριακής απόσβεσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 9567,6 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Υπολογίστηκαν η ειδική και ολική ενεργότητα της PAL και εκφράστηκαν ως μmol κινναμικού οξέως mg<sup>-1</sup> πρωτεΐνης h<sup>-1</sup> και μmol κινναμικού οξέως g<sup>-1</sup> DW h<sup>-1</sup>, αντίστοιχα.

### **3.2.8.3. Εκχύλιση προσδιορισμός ενεργοτήτων των PPO και POD**

Η εκχύλιση και ο προσδιορισμός της ενεργότητας των ενζύμων PPO και POD βασίστηκε σε συγκριτική εξέταση διαφόρων μεθόδων (Ayaz et al., 2008; Lichanporn et al., 2009; Liu et al., 2005; Qin et al., 2003; Yingsanga et al., 2008).

Κατά την εκχύλιση 2 g κονιορτοποιημένου (σε υγρό άζωτο) σπέρματος εκχυλίστηκαν με 10 ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος 0,05 M (pH = 7,0), το οποίο περιείχε 2% PVPP (w/v), 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) και 0,1% Triton-X (w/v). Το μείγμα ομογενοποιούνταν σε συσκευή Ultra-Turrax για 40 s (13500 rpm). Στη συνέχεια το ομογενοποιημένο δείγμα μεταφέρθηκε σε σφραγιζόμενο φιαλίδιο φυγοκέντρου διηθούμενο από cheesecloth και ακολουθούσε φυγοκέντριση στα 20.000 g για 20 min στους 4° C. Τέλος

έγινε λήψη της υπερκείμενης φάσης, εκχύλισμα στο οποίο γινόταν η μέτρηση των ενεργοτήτων PPO, POD και της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών. Όλη η διαδικασία της εκχύλισης έγινε σε θερμοκρασία 4° C.

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της PPO, 0,1 ml εκχυλίσματος προστέθηκε σε 2 ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος 0,05 M (pH = 6,2) και 0,5 ml διαλύματος κατεχόλης 0,05 M. Έγινε λήψη της απορρόφησης 3 min μετά την προσθήκη του δείγματος στα 420 nm. Για τον υπολογισμό της ενεργότητας της PPO χρησιμοποιήθηκε η διαφορά της απορρόφησης του δείγματος σε σχέση με τυφλό δείγμα. Η παρασκευή του τυφλού γινόταν με την διαδικασία που περιγράφεται για το δείγμα αλλά με προσθήκη 0,1 ml ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης αντί για εκχύλισμα. Μία μονάδα (Unit) ενεργότητας της PPO θεωρήθηκε η μεταβολή της απορρόφησης κατά 0,01 μονάδες. Υπολογίστηκαν η ειδική και ολική ενεργότητα της PPO και εκφράστηκαν ως Unit mg<sup>-1</sup> πρωτεΐνης min<sup>-1</sup> και Unit g<sup>-1</sup> DW min<sup>-1</sup>, αντίστοιχα.

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της POD, σε 2,5 ml διαλύματος γουαϊακόλης 0,025 M (σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M, pH = 6,0) προστέθηκαν 0,2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,02 M. Ακολούθησε προσθήκη 0,1 ml εκχυλίσματος και έγινε λήψη της απορρόφησης 2 min μετά την προσθήκη του δείγματος στα 470 nm. Για τον υπολογισμό της ενεργότητας της POD χρησιμοποιήθηκε η διαφορά της απορρόφησης του δείγματος σε σχέση με τυφλό δείγμα. Η παρασκευή του τυφλού έγινε με την ίδια διαδικασία που περιγράφεται για το δείγμα αλλά με προσθήκη 0,1 ml ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης αντί για εκχύλισμα. Μία μονάδα (Unit) ενεργότητας της POD θεωρήθηκε η μεταβολή της απορρόφησης κατά 0,01 μονάδες. Υπολογίστηκαν η ειδική και ολική ενεργότητα της POD και εκφράστηκαν ως Unit mg<sup>-1</sup> πρωτεΐνης min<sup>-1</sup> και Unit g<sup>-1</sup> DW min<sup>-1</sup>, αντίστοιχα.

#### **3.2.8.4. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών στο εκχύλισμα των ενζύμων**

Η μέτρηση των πρωτεϊνών στο εκχύλισμα των ενζύμων έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο του Bradford (1976). Σε 5 ml αντιδραστήριου Bradford προστέθηκαν 0,1 ml εκχυλίσματος και έγινε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 min. Κατόπιν λήφθηκε η απορρόφηση στα 595 nm. Το αντιδραστήριο Bradford παρασκευάστηκε ώστε να περιέχει 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7 αιθανόλη (w/v) και 8,5% φωσφορικό οξύ (w/v). Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών έγινε με βάση πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης από ορό βοοειδούς (BSA, Bovine serum albumin).



### **3.2.9. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων**

#### **Πείραμα Α**

Η επίδραση των παραγόντων (ποικιλία, χρόνος συντήρησης, τρόπος έκθεσης στη συντήρηση), επί των χαρακτηριστικών που εξετάστηκαν εκτιμήθηκε με τρι-παραγοντική ανάλυση της διασποράς (ANOVA) στα δείγματα από τις δειγματοληψίες 20 και 40 d. Για κάθε τρόπο έκθεσης (σπέρματα με- ή χωρίς κέλυφος) έγινε δι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία × χρόνος) με σκοπό να εκτιμηθούν οι μεταβολές των χαρακτηριστικών από την έναρξη (0 d) έως και το πέρας της συντήρησης (40 d), ενώ για την εκτίμηση των διαφορών μεταξύ των ποικιλιών κατά τη συγκομιδή (0 d) έγινε μόνο-παραγοντική ANOVA.

#### **Πείραμα Β**

Η επίδραση των παραγόντων (ποικιλία, χρόνος συντήρησης, αποξήρανση), επί των χαρακτηριστικών που εξετάστηκαν εκτιμήθηκε με τρι-παραγοντική ANOVA στα δείγματα από τις δειγματοληψίες 0, 10 και 20 d. Παράλληλα έγινε δι-παραγοντική ANOVA (χρόνος × αποξήρανση) για κάθε ποικιλία χωριστά περιλαμβάνοντας δείγματα από όλες τις δειγματοληψίες.

#### **Πείραμα Γ**

Στο πρώτο πειραματικό μέρος η επίδραση των παραγόντων (χρόνος συντήρησης, θερμοκρασία συντήρησης) εκτιμήθηκε με δι-παραγοντική ANOVA στα δείγματα από όλες τις δειγματοληψίες (0, 1, 4, 7, 10, 20, 30 d). Στο δεύτερο μέρος έγινε τρι-παραγοντική ANOVA (χρόνος × θερμοκρασία × ουσία εμφάνισης) περιλαμβάνοντας δείγματα από τις δειγματοληψίες 10, 20, 30 d. Για την εκτίμηση των μεταβολών από την έναρξη της συντήρησης έγιναν μόνο-παραγοντικές ANOVA για κάθε συνδυασμό θερμοκρασίας και ουσίας εμφάνισης συμπεριλαμβάνοντας και τα αρχικά δείγματα (0 d).

#### **Πείραμα Δ**

Η επίδραση όλων των ουσιών εμφάνισης συγκριτικά εκτιμήθηκε με μόνο-παραγοντική ANOVA περιλαμβάνοντας δείγματα από τη δειγματοληψία των 20 d. Για την εκτίμηση των μεταβολών από την έναρξη της συντήρησης έγιναν μόνο-παραγοντικές ANOVA για κάθε ουσία εμφάνισης.

Οι συγκρίσεις των μέσων και για τις τέσσερις πειραματικές περιόδους έγιναν με βάση τη μέθοδο της έντιμης σημαντικής διαφοράς (HSD, Honest Significant Difference) της μεθόδου Tukey-HSD.

Οι αναλύσεις κυρίων συνιστωσών (PCA, Principal Component Analysis) και συσχέτισης, εφαρμόστηκαν με σκοπό να γίνει γενική εκτίμηση της παραλλακτικότητας, και

να διερευνηθούν οι σχέσεις μεταξύ των μεταβλητών (χαρακτηριστικά). Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με το λογισμικό JMP 7.0.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

### 3.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.3.1. Χαρακτηριστικά ολόκληρων ενδοκαρπίων καρδιάς (ΟΕ ή νοπά σπέρματα με-κλύφος)

Στο Πείραμα Α, πριν τη συντήρηση, τα ΟΕ της ‘Chandler’ και της ‘Ιόλη’ είχαν μεγαλύτερο μέγεθος και βάρος σε σχέση με των ‘Franquette’ και ‘Hartley’ που για τα περισσότερα χαρακτηριστικά είχαν παρόμοιες τιμές (Πίνακας 3.2). Τα ΟΕ της ‘Ιόλη’ είχαν το μεγαλύτερο πλάτος (38,4 mm) και βάρος σπέρματος (11,1 g), ενώ τα ΟΕ της ‘Hartley’ είχαν το μικρότερο βάρος κελύφους (7,3 g) και ποσοστό σπέρματος (42,6%).

**Πίνακας 3. 2.** Διαστάσεις και μέγεθος στα νοπά ολόκληρα ενδοκάρπια (ΟΕ) τεσσάρων ποικιλιών καρδιάς κατά τη συγκομιδή στο Πείραμα Α.

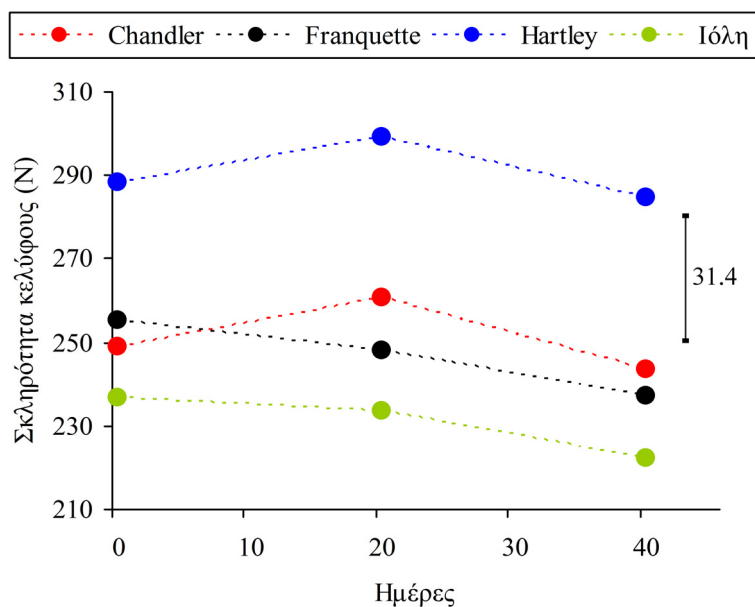
Ποικιλία	Μήκος ΟΕ (mm)	Πλάτος ΟΕ (mm)	Βάρος ΟΕ (g)	Βάρος σπέρματος (g)	Βάρος κελύφους (g)	% σπέρμα (w/w)
Chandler	40,02 <sup>ab†</sup>	33,36 <sup>b</sup>	16,73 <sup>b</sup>	9,17 <sup>b</sup>	7,55 <sup>ab</sup>	54,6 <sup>ab</sup>
Franquette	39,83 <sup>b</sup>	32,26 <sup>c</sup>	13,04 <sup>c</sup>	6,96 <sup>c</sup>	6,08 <sup>b</sup>	53,4 <sup>b</sup>
Hartley	38,28 <sup>b</sup>	32,22 <sup>c</sup>	12,66 <sup>c</sup>	5,39 <sup>c</sup>	7,27 <sup>c</sup>	42,6 <sup>c</sup>
Ιόλη	41,76 <sup>a</sup>	38,44 <sup>a</sup>	19,22 <sup>a</sup>	11,12 <sup>a</sup>	8,10 <sup>a</sup>	57,8 <sup>a</sup>
<i>P<sub>C</sub></i> <sup>††</sup>	***	***	***	***	***	***

† Οι μέσοι της κάθε μεταβλητής ακολουθούμενοι από το ίδιο πεζό γράμμα εντός της στήλης, δεν διαφέρουν σημαντικά με βάση την μόνο-παραγοντική ANOVA.

†† Πιθανότητα της επίδρασης της ποικιλίας (*P<sub>C</sub>*).

NS μη σημαντικό, \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

Η αρχική σκληρότητα του κελύφους κυμάνθηκε από 237 έως 288 N μεταξύ των τεσσάρων ποικιλιών (Γράφημα 3.1). Το κέλυφος της ‘Hartley’ είχε μεγαλύτερη σκληρότητα από τα κέλυφη των υπολοίπων ποικιλιών, οι οποίες είχαν παρόμοιες τιμές μεταξύ τους (Πίνακας 3.3). Κατά τη συντήρηση, η σκληρότητα του κελύφους δεν επηρεάστηκε και στις περισσότερες δειγματοληψίες το κέλυφος της ‘Hartley’ εξακολουθούσε να έχει την υψηλότερη σκληρότητα.



**Γράφημα 3. 1.** Σκληρότητα κελύφους στα νωπά ολόκληρα ενδοκάρπια (OE) τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς συντηρούμενα στον 1° C έως 40 d, στο Πείραμα Α. Η κάθετη μπάρα αντιστοιχεί στην τιμή HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ , από δι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  χρόνος συντήρησης).

Κατά τη 40-ήμερη συντήρηση των OE, παρατηρήθηκε σταδιακή απώλεια βάρους (WL) που ήταν εντονότερη κατά τις πρώτες 20 d φτάνοντας περίπου το 20%, χωρίς όμως να υπάρχουν διαφοροποιήσεις μεταξύ των ποικιλιών (Πίνακας 3.4). Μετά από 40 d, οι τιμές WL κυμάνθηκαν από 25% έως 32%, όπου τα OE της ‘Hartley’ είχαν τις μικρότερες απώλειες σε σχέση με τις υπόλοιπες ποικιλίες.

**Πίνακας 3. 3.** Πιθανότητες των επιδράσεων της ποικιλίας ( $P_c$ ) του χρόνου συντήρησης ( $P_t$ ) και της αλληλεπίδρασης τους ( $P_c \times t$ ) επί της σκληρότητας του κελύφους (Γράφημα 3.1), στα νωπά ολόκληρα ενδοκάρπια τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς κατά τη συντήρηση στο Πείραμα Α.

ΠΠ†	Σκληρότητα κελύφους
$P_c$	***
$P_t$	NS
$P_c \times t$	NS

† ΠΠ: πηγή παραλλακτικότητας.

NS μη σημαντικό, \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

Πριν τη συντήρηση, τα επίπεδα αναπνοής των ΟΕ ήταν μεταξύ 0,54 και 0,87 mmol CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Πίνακας 3.5). Η μεγαλύτερη παραγωγή CO<sub>2</sub> καταγράφηκε στην ‘Chandler’ ακολουθούμενη από την ‘Franquette’, ενώ τα χαμηλότερα επίπεδα βρέθηκαν στις ‘Hartley’ και ‘Ιόλη’ οι οποίες δεν διέφεραν μεταξύ τους.

Κατά τη συντήρηση, η αναπνοή των ΟΕ όλων των ποικιλιών μειώθηκε σημαντικά. Συγκριμένα, σταδιακή μείωση της αναπνοής από τις πρώτες 20 d παρατηρήθηκε στις ‘Franquette’ και ‘Hartley’, ενώ στις ‘Chandler’ και ‘Ιόλη’ σημαντικές μειώσεις βρέθηκαν την τεσσαρακοστή ημέρα. Για όλες τις ποικιλίες και καθ’ όλη τη διάρκεια της συντήρησης δεν ανιχνεύθηκε παραγωγή αιθυλενίου από τα ΟΕ.

**Πίνακας 3. 4.** Απώλεια βάρους των νωπών ολόκληρων ενδοκαρπίων (ΟΕ) και των σπερμάτων τεσσάρων ποικιλιών καρδιάς συντηρούμενα στον 1° C έως 40 d, στο Πείραμα Α.

Ποικιλία	Απώλεια βάρους (% w/w)			
	ΟΕ		Σπέρμα	
	Ημέρες στον 1° C			
	20	40	20	40
Chandler	21,3 <sup>aB†</sup>	32,5 <sup>aA</sup>	13,9 <sup>aB</sup>	16,7 <sup>aA</sup>
Franquette	21,8 <sup>aB</sup>	28,9 <sup>abA</sup>	12,8 <sup>aB</sup>	17,5 <sup>aA</sup>
Hartley	19,5 <sup>aB</sup>	25,3 <sup>bA</sup>	13,0 <sup>aB</sup>	17,6 <sup>aA</sup>
Ιόλη	21,8 <sup>aB</sup>	29,8 <sup>aA</sup>	12,8 <sup>aB</sup>	17,0 <sup>aA</sup>
<i>P<sub>c</sub></i> <sup>††</sup>	***		NS	
<i>P<sub>t</sub></i>	***		***	
<i>P<sub>c</sub> × t</i>	**		NS	

† Οι μέσοι του κάθε μέρους του καρπού ακολουθούμενοι από το ίδιο πεζό γράμμα εντός της στήλης, δεν διαφέρουν σημαντικά; οι μέσοι του κάθε μέρους του καρπού ακολουθούμενοι από το ίδιο κεφαλαίο γράμμα εντός της γραμμής, δεν διαφέρουν σημαντικά; οι συγκρίσεις των μέσων αντιστοιχούν σε δι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία × χρόνος συντήρησης).

†† Πιθανότητες των επιδράσεων της ποικιλίας (*P<sub>c</sub>*), του χρόνου συντήρησης (*P<sub>t</sub>*) και της αλληλεπίδρασης τους (*P<sub>c</sub> × t*).

NS μη σημαντικό, \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

**Πίνακας 3. 5.** Αναπνοή των νωπών ολόκληρων ενδοκαρπίων (OE) και σπερμάτων τεσσάρων ποικιλιών καρδιάς συντηρούμενα στον 1° C έως 40 d, στο Πείραμα Α.

Ποικιλία	Αναπνοή στους 20° C (mmol CO <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )					
	OE			Σπέρμα		
	Ημέρες στον 1° C					
	0	20	40	0	20	40
Chandler	0,866 <sup>aB†</sup>	0,987 <sup>aA</sup>	0,515 <sup>aC</sup>	1,160 <sup>aA</sup>	0,177 <sup>aB</sup>	0,026 <sup>aC</sup>
Franquette	0,773 <sup>bA</sup>	0,640 <sup>bB</sup>	0,158 <sup>bC</sup>	0,945 <sup>bA</sup>	0,080 <sup>bB</sup>	0,030 <sup>aB</sup>
Hartley	0,539 <sup>cA</sup>	0,248 <sup>cB</sup>	0,099 <sup>bC</sup>	0,582 <sup>dA</sup>	0,045 <sup>bB</sup>	0,011 <sup>bB</sup>
Ιόλη	0,621 <sup>cA</sup>	0,691 <sup>bA</sup>	0,169 <sup>bB</sup>	0,752 <sup>cA</sup>	0,050 <sup>bB</sup>	0,012 <sup>bB</sup>
<i>Pc</i> <sup>††</sup>		***			***	
<i>Pt</i>		***			***	
<i>Pc × t</i>		***			***	

† Οι μέσοι του κάθε μέρους του καρπού ακολουθούμενοι από το ίδιο πεζό γράμμα εντός της στήλης, δεν διαφέρουν σημαντικά; οι μέσοι του κάθε μέρους του καρπού ακολουθούμενοι από το ίδιο κεφαλαίο γράμμα εντός της γραμμής, δεν διαφέρουν σημαντικά; οι συγκρίσεις των μέσων αντιστοιχούν σε δι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία × χρόνος συντήρησης).

†† Πιθανότητες των επιδράσεων της ποικιλίας (*Pc*), του χρόνου συντήρησης (*Pt*) και της αλληλεπίδρασης τους (*Pc × t*).

\*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

### 3.3.2. Απώλεια βάρους (WL), αναπνοή, παραγωγή αιθυλενίου και χρώμα σπέρματος

#### 3.3.2.1. Απώλεια βάρους (WL)

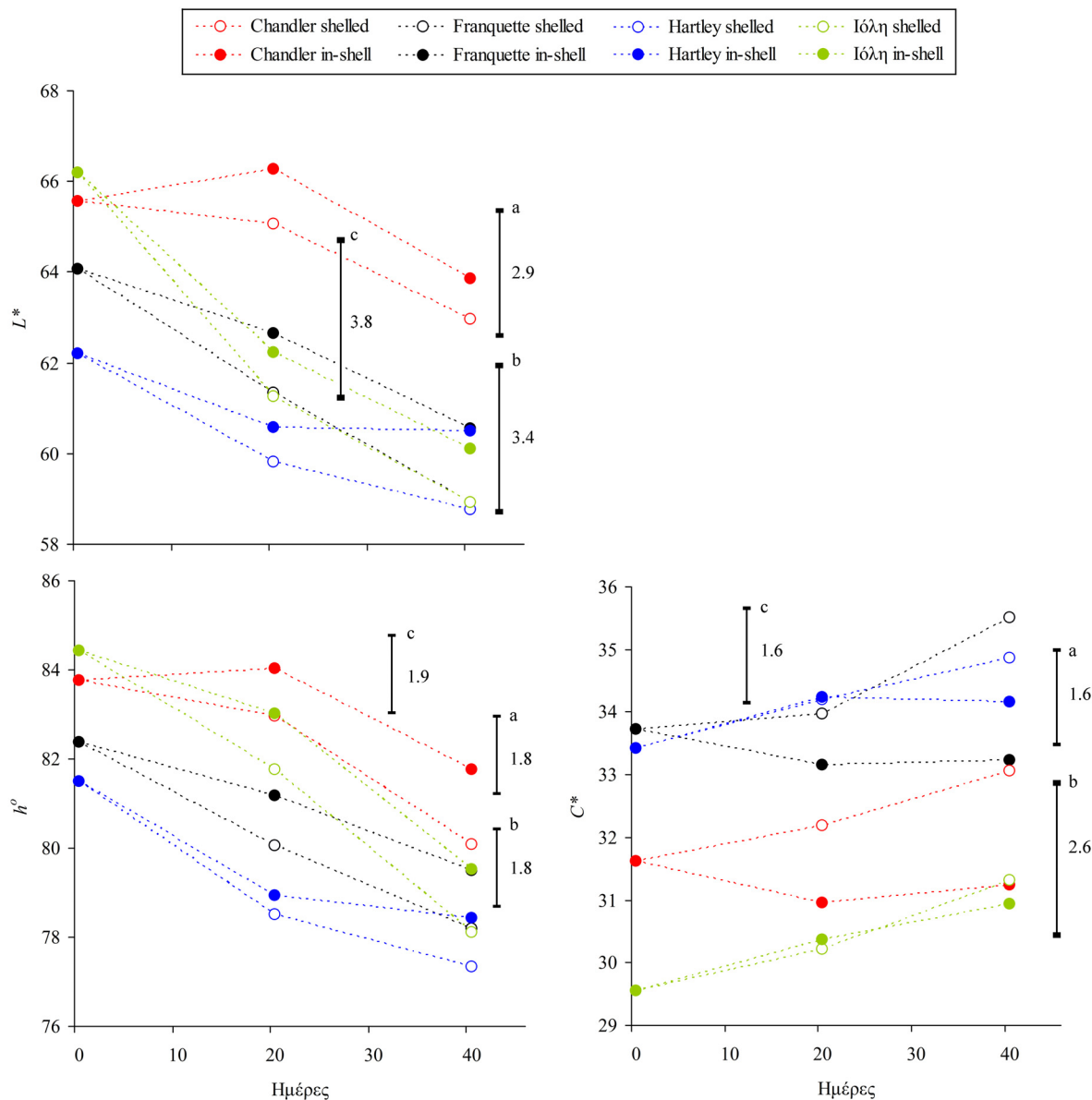
Στο Πείραμα Α, σταδιακή WL σπερμάτων παρατηρήθηκε κατά τη συντήρηση, η οποία έφτασε τα επίπεδα περίπου του 13% και 18% μετά από 20 d και 40 d, αντίστοιχα, κατά μέσο όρο για όλες τις ποικιλίες (Πίνακας 3.4). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα ποσοστά απωλειών μεταξύ των ποικιλιών.

#### 3.3.2.2. Αναπνοή και έκλυση αιθυλενίου σπέρματος

Τα αρχικά επίπεδα αναπνοής των σπερμάτων ήταν μεταξύ 0,58 και 1,16 mmol CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Πίνακας 3.5). Τα σπέρματα της ‘Chandler’ είχαν τα υψηλότερα επίπεδα, της ‘Hartley’ τα χαμηλότερα, ενώ οι άλλες δυο ποικιλίες είχαν ενδιάμεσες τιμές. Η αναπνοή μειώθηκε δραστικά κατά τη συντήρηση φτάνοντας σε επίπεδα κάτω από 0,03 mmol CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης τα σπέρματα της ‘Chandler’ είχαν υψηλότερη αναπνοή από αυτά των υπόλοιπων ποικιλιών. Όπως και στην περίπτωση των OE, δεν ανιχνεύθηκε έκλυση αιθυλενίου από τα σπέρματα των καρδιών.

### 3.3.2.3. Χρώμα σπέρματος

Πριν τη συντήρηση, οι τιμές των παραμέτρων του χρώματος κυμάνθηκαν από 62-66 για το  $L^*$ , 81-84 για το  $h^o$  και 30-34 για το  $C^*$  (Γράφημα 3.2). Τα σπέρματα της ‘Chandler’ και της ‘Ιόλη’ είχαν τις υψηλότερες τιμές  $L^*$  και  $h^o$ , ενώ των ‘Franquette’ και ‘Hartley’ είχαν το υψηλότερο  $C^*$  (Πίνακας 3.6)



**Γράφημα 3. 2.** Παράμετροι  $L^*$ ,  $h^o$  και  $C^*$  του χρώματος στα νοπά σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς συντηρημένα χωρίς- (shelled) ή με- (in-shell) κέλυφος στον  $1^o$  C έως 40 d, στο Πείραμα Α. Οι κάθετες μπάρες αντιστοιχούν στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ . Μπάρα (a), από δι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  χρόνος συντήρησης) περιλαμβάνοντας όλες τις ημέρες συντήρησης για τα σπέρματα χωρίς-κέλυφος; Μπάρα (b), από δι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  χρόνος συντήρησης) περιλαμβάνοντας όλες τις ημέρες συντήρησης για τα σπέρματα με-κέλυφος; Μπάρα (c), από τρι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  χρόνος συντήρησης  $\times$  τρόπος συντήρησης) περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα από την 20 d και την 40 d.

Κατά τη συντήρηση παρατηρήθηκαν μεταβολές των όλων παραμέτρων του χρώματος οι οποίες ήταν εντονότερες με την πάροδο του χρόνου (Γράφημα 3.2, Πίνακας 3.6). Συγκεκριμένα, σημαντικές μειώσεις των  $L^*$  και  $h^o$  παρατηρήθηκαν τόσο στα σπέρματα που συντηρήθηκαν με-κέλυφος όσο και σε αυτά χωρίς-κέλυφος. Στα σπέρματα χωρίς-κέλυφος το  $C^*$  αυξήθηκε, ενώ το  $C^*$  των σπερμάτων με-κέλυφος δεν επηρεάστηκε από την συντήρηση. Οι μεταβολές των παραμέτρων του χρώματος κατά τη συντήρηση είχαν παρόμοια γενική τάση για όλες τις ποικιλίες, αλλά παρατηρήθηκαν ορισμένες διαφοροποιήσεις μεταξύ των ποικιλιών. Στα σπέρματα της ‘Chandler’ τόσο χωρίς- όσο και με-κέλυφος, καθώς και σε αυτά της ‘Hartley’ με-κέλυφος δεν παρατηρήθηκε μείωση του  $L^*$  καθ’ όλη τη συντήρηση.

Επίσης, μέχρι τις 20 d δεν παρατηρήθηκε μείωση του  $h^o$  στα σπέρματα των ‘Chandler’, ‘Hartley’ και ‘Ιόλη’ που συντηρήθηκαν με-κέλυφος, καθώς επίσης σε αυτά της ‘Chandler’ χωρίς-κέλυφος. Η κύρια επίδραση του τρόπου συντήρησης έδειξε ότι σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης τα σπέρματα που συντηρήθηκαν με-κέλυφος είχαν υψηλότερες τιμές  $L^*$  και  $h^o$  σε σύγκριση με αυτά χωρίς-κέλυφος.

**Πίνακας 3. 6.** Πιθανότητες των επιδράσεων της ποικιλίας ( $Pc$ ), του χρόνου συντήρησης ( $Pt$ ), του τρόπου συντήρησης ( $Ps$ ) και των αλληλεπιδράσεων τους επί των παραμέτρων  $L^*$ ,  $h^o$  και  $C^*$  του χρώματος (Γράφημα 3.2), στα νωπά σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρδιάς κατά τη συντήρηση στο Πείραμα Α.

ΠΠ†	Τρόπος συντήρησης	Μεταβλητή		
		$L^*$	$h^o$	$C^*$
$Pc$ ††		***	***	***
$Pc$ †††	Χωρίς-κέλυφος	***	***	***
$Pt$		***	***	***
$Pc \times t$		**	**	NS
$Pc$	Με-κέλυφος	***	***	***
$Pt$		***	***	NS
$Pc \times t$		*	***	NS
$Pc$ ††††		***	***	***
$Pt$		***	***	*
$Ps$		**	***	***
$Pc \times t$		NS	***	NS
$Pc \times s$		NS	NS	NS
$Pt \times s$		NS	NS	NS
$Pc \times t \times s$		NS	NS	NS

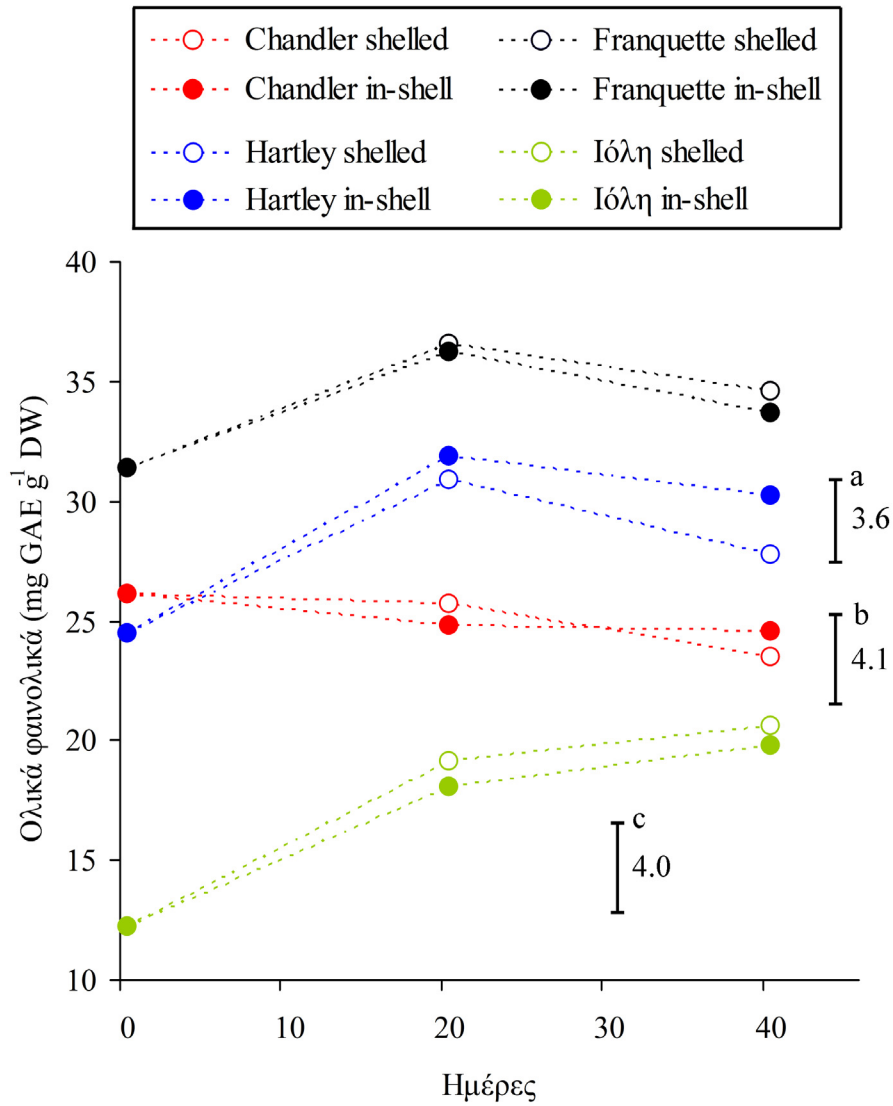
† ΠΠ: πηγή παραλλακτικότητας.  
†† Από μόνο-παραγοντική ANOVA περιλαμβάνοντας τις τιμές κατά την 0 d.  
††† Από δι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία × χρόνος συντήρησης) περιλαμβάνοντας όλες τις ημέρες συντήρησης για τα χωρίς- ή με-κέλυφος.  
†††† Από τρι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία × χρόνος συντήρησης × τρόπος συντήρησης) περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα από την 20 d και την 40 d.  
NS μη σημαντικό, \* σημαντικό  $P < 0,05$ , \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .



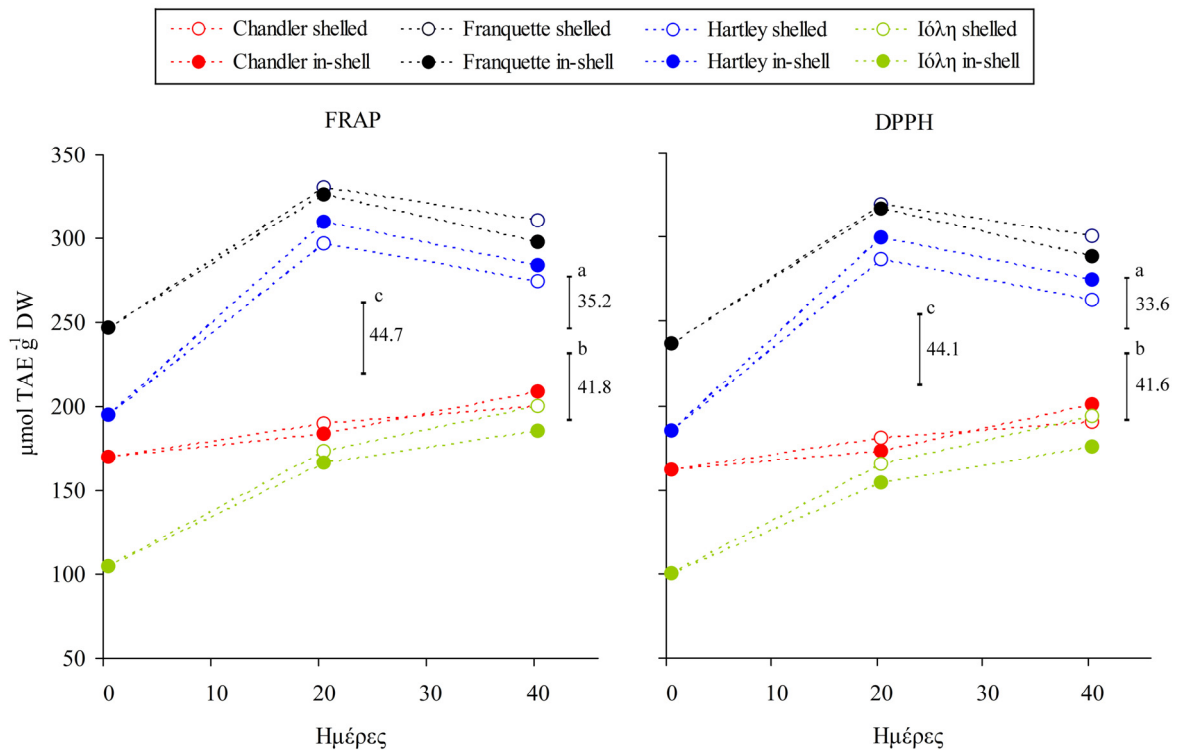
### 3.3.3. Ολικά φαινολικά (TP) και ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) σπέρματος

Στο Πείραμα Α, η αρχική συγκέντρωση TP κυμάνθηκε από 12,2 έως 31,4 mg GAE g<sup>-1</sup> DW, ενώ η TAC ήταν από 104,2 έως 246,6 μmol TAE g<sup>-1</sup> DW εκτιμώμενη με τη FRAP και από 99,8 έως 236,6 μmol TAE g<sup>-1</sup> DW εκτιμώμενη με την DPPH (Γραφήματα 3.3, 3.4). Οι υψηλότερες τιμές TP και TAC προσδιορίστηκαν στα σπέρματα της ‘Franquette’, οι χαμηλότερες σε εκείνα της ‘Ιόλη’.

Κατά τη συντήρηση, μεγάλη αύξηση τόσο των TP όσο και της TAC, εκτιμώμενη είτε με τη FRAP είτε την DPPH, παρατηρήθηκε στα σπέρματα όλων των ποικιλιών εκτός της ‘Chandler’ που παρέμειναν στα ίδια επίπεδα (Γραφήματα 3.3 και 3.4, Πίνακας 3.7). Οι μεταβολές αυτές ήταν πιο έντονες κατά τις πρώτες 20 d, οδηγώντας σε αυξημένες τιμές TP, FRAP και DPPH κατά 1,2-, 1,6- και 1,6-φορές, αντίστοιχα, κατά μέσο όρο για όλες τις ποικιλίες. Μετά από 40 d, τα σπέρματα διατήρησαν αυξημένες τιμές TP και TAC σε σχέση με τις αρχικές, αλλά δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των 20 d και 40 d. Σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης ο τρόπος συντήρησης δεν επηρέασε τα TP και την TAC των σπερμάτων, καθώς βρέθηκαν παρόμοιες τιμές μεταξύ των σπερμάτων που συντηρήθηκαν με-κέλυφος και χωρίς-κέλυφος.



**Γράφημα 3. 3.** Ολικά φαινολικά στα νοπά σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρδιάς συντηρημένα χωρίς- (shelled) ή με- (in-shell) κέλυφος στον 1° C έως 40 d, στο Πείραμα Α. Οι κάθετες μπάρες αντιστοιχούν στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ . Μπάρα (a), από δι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  χρόνος συντήρησης) περιλαμβάνοντας όλες τις ημέρες συντήρησης για τα σπέρματα χωρίς-κέλυφος; Μπάρα (b), από δι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  χρόνος συντήρησης) περιλαμβάνοντας όλες τις ημέρες συντήρησης για τα σπέρματα με-κέλυφος; Μπάρα (c), από τρι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  χρόνος συντήρησης  $\times$  τρόπος συντήρησης) περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα από την 20 d και την 40 d.



**Γράφημα 3. 4.** Αντιοξειδωτική ικανότητα, εκτιμούμενη με τις μεθόδους FRAP και DPPH, στα νωπά σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς συντηρημένα χωρίς- (shelled) ή με- (in-shell) κέλυφος στον 1° C έως 40 d, στο Πείραμα Α. Οι κάθετες μπάρες αντιστοιχούν στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ . Μπάρα (a), από δι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  χρόνος συντήρησης) περιλαμβάνοντας όλες τις ημέρες συντήρησης για τα σπέρματα χωρίς-κέλυφος; Μπάρα (b), από δι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  χρόνος συντήρησης) περιλαμβάνοντας όλες τις ημέρες συντήρησης για τα σπέρματα με-κέλυφος; Μπάρα (c), από τρι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  χρόνος συντήρησης  $\times$  τρόπος συντήρησης) περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα από την 20 d και την 40 d.

**Πίνακας 3. 7.** Πιθανότητες των επιδράσεων της ποικιλίας (*Pc*), του χρόνου συντήρησης (*Pt*), του τρόπου συντήρησης (*Ps*) και των αλληλεπιδράσεων τους επί των ολικών φαινολικών (TP) και αντιοξειδωτικής ικανότητας, εκτιμούμενης με τις μεθόδους FRAP και DPPH (Γραφήματα 3.3, 3.4), στα νωπά σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρδιάς κατά τη συντήρηση, στο Πείραμα Α.

ΠΠ †		Μεταβλητή		
		TP	FRAP	DPPH
<i>Pc</i> ††		***	***	***
<i>Pc</i> †††	Χωρίς-κέλυφος	***	***	***
<i>Pt</i>		***	***	***
<i>Pc</i> × <i>t</i>		***	***	***
<i>Pc</i>	Με-κέλυφος	***	***	***
<i>Pt</i>		***	***	***
<i>Pc</i> × <i>t</i>		***	***	***
<i>Pc</i> ††††		**	***	***
<i>Pt</i>		NS	NS	NS
<i>Ps</i>		NS	NS	NS
<i>Pc</i> × <i>t</i>		NS	***	***
<i>Pc</i> × <i>s</i>		NS	NS	NS
<i>Pt</i> × <i>s</i>		NS	NS	NS
<i>Pc</i> × <i>t</i> × <i>s</i>		NS	NS	NS

† ΠΠ: πηγή παραλλακτικότητας.

†† Από μόνο-παραγοντική ANOVA περιλαμβάνοντας τις τιμές κατά την 0 d.

††† Από δι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία × χρόνος συντήρησης) περιλαμβάνοντας όλες τις ημέρες συντήρησης για τα με- ή χωρίς-κέλυφος.

†††† Από τρι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία × χρόνος συντήρησης × τρόπος συντήρησης) περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα από την 20 d και την 40 d.

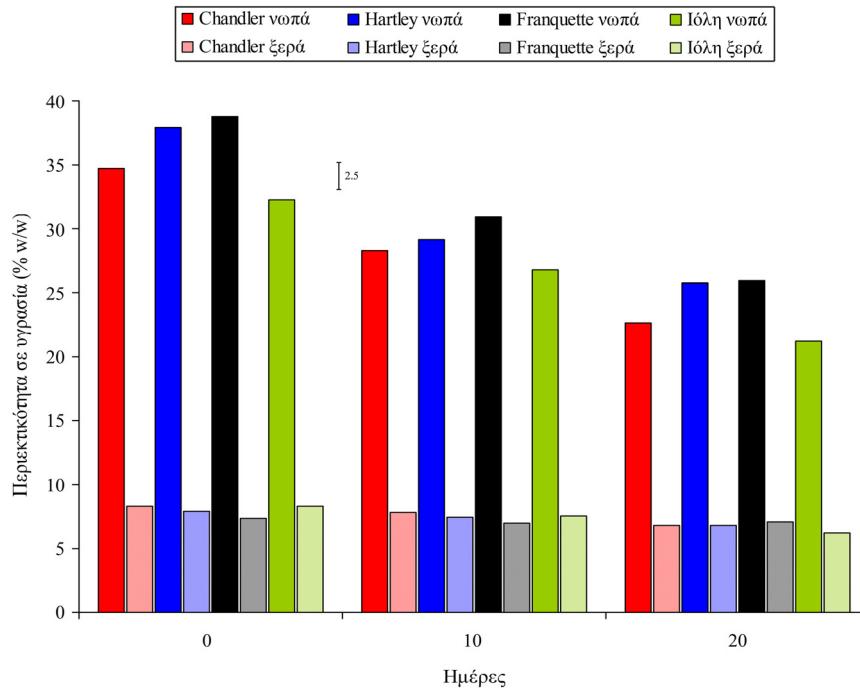
NS μη σημαντικό, \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

### 3.3.4. Αποξήρανση καρδιών έπειτα από έκθεση νωπών καρπών σε χαμηλή θερμοκρασία

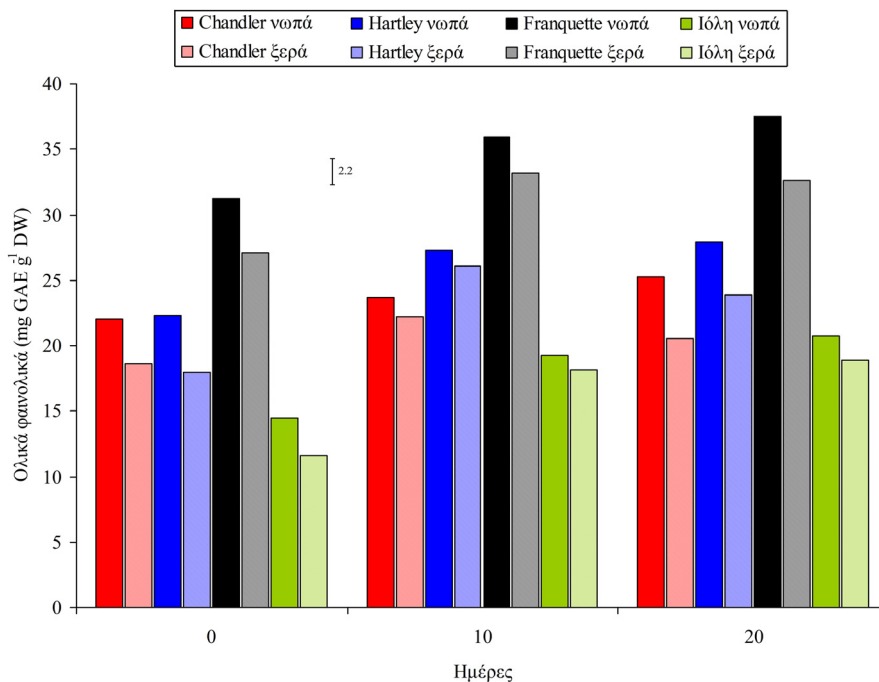
Στο Πείραμα Β, η αρχική περιεκτικότητα σε υγρασία των νωπών σπερμάτων κυμάνθηκε από 32,2% έως 38,8%, με τα σπέρματα των ‘Franquette’ και ‘Hartley’ να έχουν υψηλότερες τιμές από αυτά των ‘Chandler’ και ‘Ιόλη’ (Γράφημα 3.5, Πίνακας 3.8). Η περιεκτικότητα των νωπών σπερμάτων σε υγρασία είχε τάση μείωσης κατά τη συντήρηση στον 1° C φτάνοντας τα επίπεδα του 21,2-26% μετά από 20 d. Σε κάθε δειγματοληψία (0, 10, 20 d), η αποξήρανση των νωπών ενδοκαρπίων οδήγησε σε μείωση της υγρασίας των σπερμάτων σε επίπεδα κάτω του 8,3%, χωρίς ωστόσο να υπάρχουν διαφορές στα αποξηραμένα σπέρματα μεταξύ των ποικιλιών.

Η αρχική συγκέντρωση των TP στα νωπά σπέρματα κυμάνθηκε μεταξύ 14,5 to 31,3 mg GAE g<sup>-1</sup> DW, ενώ των αποξηραμένων μεταξύ 11,6 και 27,1 mg GAE g<sup>-1</sup>

DW, και οι διαφορές αυτές μεταξύ νωπών και αποξηραμένων σπερμάτων ήταν σημαντικές (Γράφημα 3.6, Πίνακας 3.8).



**Γράφημα 3. 5.** Περιεκτικότητα σε υγρασία στα νοπά και αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς που προέκυψαν μετά από τη συντήρηση νοπών ολόκληρων ενδοκαρπίων (OE) στον 1° C έως 20 d, στο Πείραμα Β. Οι κάθετες μπάρες αντιστοιχούν στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ . Για κάθε μεταβλητή η HSD προέκυψε από τρι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  χρόνος συντήρησης  $\times$  αποξήρανση) περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα από την 0 d έως και την 20 d.



**Γράφημα 3. 6.** Ολικά φαινολικά στα νοπά και αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρυδιάς που προέκυψαν μετά από τη συντήρηση νοπών ολόκληρων ενδοκαρπίων (OE) στον 1° C έως 20 d, στο Πείραμα Β. Οι κάθετες μπάρες αντιστοιχούν στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ . Για κάθε μεταβλητή η HSD προέκυψε από τρι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία  $\times$  χρόνος συντήρησης  $\times$  αποξήρανση) περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα από την 0 d έως και την 20 d.

Κατά τη συντήρηση παρατηρήθηκαν σημαντικές αυξήσεις των TP στα νωπά σπέρματα όλων των ποικιλιών, οι οποίες ήταν μεγαλύτερες κατά τις πρώτες 10 d, ωστόσο η αποξήρανση οδήγησε σε απώλειες των TP κατά 16%, 6% και 14% κατά μέσο όρο για όλες τις ποικιλίες, μετά από 0, 10 και 20 d, αντίστοιχα. Η επίδραση της συντήρησης στον 1° C στην αύξηση των TP παρέμεινε σημαντική ακόμα και μετά την αποξήρανση, καθώς τα αποξηραμένα σπέρματα των 10 και 20 d είχαν κατά 1.3- και 1.3-φορές αυξημένα επίπεδα TP, αντίστοιχα, σε σχέση με τα αποξηραμένα των 0 d.

### 3.3.5. Αλλαγές αντιοξειδωτικών σε σχέση με τη θερμοκρασία συντήρησης

#### 3.3.5.1. Πείραμα Γ

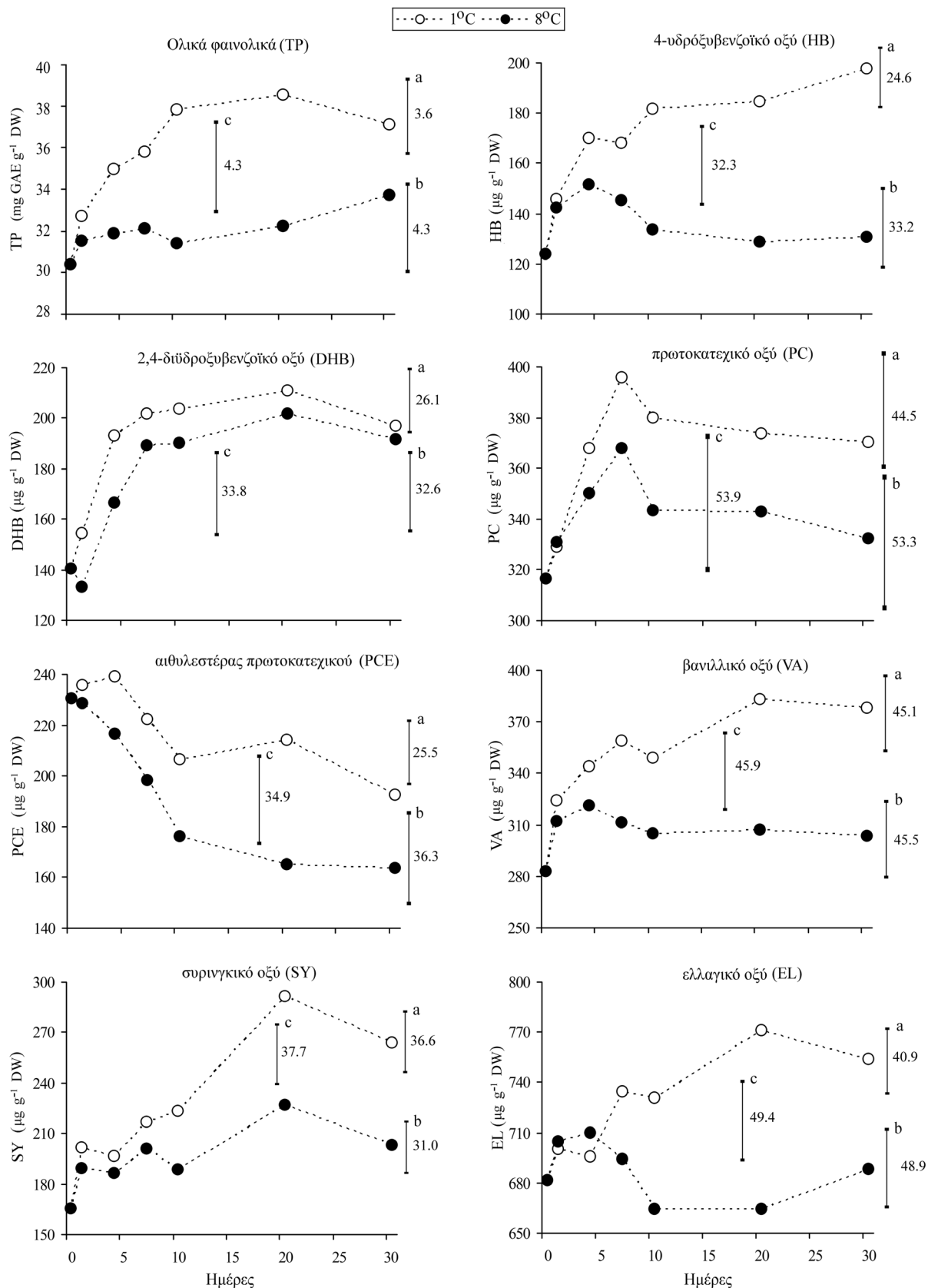
Στο Πείραμα Γ, τα αρχικά επίπεδα των TP στα νωπά σπέρματα της ‘Franquette’ ήταν 30,4 mg GAE g<sup>-1</sup> DW (Γράφημα 3.7), και στο σημείο αυτό η TAC ήταν 241,9 and 232,5 μmol TAE g<sup>-1</sup> DW, εκτιμούμενη με τις μεθόδους FRAP και DPPH, αντίστοιχα (Γράφημα 3.8). Κατά τη συντήρηση, σημαντικές αυξήσεις των TP (Πίνακας 3.9) και της TAC (Πίνακας 3.9) παρατηρήθηκαν στα σπέρματα που συντηρήθηκαν στον 1° C, αλλά δεν παρατηρήθηκε αύξηση σε καμιά από τις μεταβλητές αυτές στους 8° C. Η σημαντική αύξηση στις τιμές TP και FRAP παρουσιάστηκε από την τέταρτη ημέρα, ενώ αυξημένες τιμές της DPPH βρέθηκαν από την έβδομη ημέρα. Οι κύριες επιδράσεις έδειξαν ότι τα σπέρματα συντηρούμενα στον 1° C είχαν υψηλότερα επίπεδα TP και TAC από αυτά στους 8° C. Συγκεκριμένα, καθ’ όλη τη διάρκεια της συντήρησης τα σπέρματα που συντηρήθηκαν στον 1° C είχαν τιμές TP, FRAP και DPPH υψηλότερες κατά 1,1-φορες σε σχέση με τα σπέρματα που συντηρήθηκαν στους 8° C. Οι διαφορές στα επίπεδα αντιοξειδωτικών (TP και TAC) μεταξύ των σπερμάτων που συντηρήθηκαν στον 1° C και τους 8° C είχαν αυξανόμενη τάση μέχρι την εικοστή ημέρα και κατόπιν μειώθηκαν ελαφρά την τριακοστή.

**Πίνακας 3. 8.** Πιθανότητες των επιδράσεων της ποικιλίας (*Pc*), του χρόνου συντήρησης (*Pt*), της αποξήρανσης (*Pd*) και των αλληλεπιδράσεων τους επί της περιεκτικότητας σε υγρασία και των ολικών φαινολικών (TP) (Γραφήματα 3.5, 3.6), στα νωπά και αποξηραμένα σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών κατά τη συντήρηση νωπών ολόκληρων ενδοκαρπίων (OE) την 3<sup>η</sup> Π.

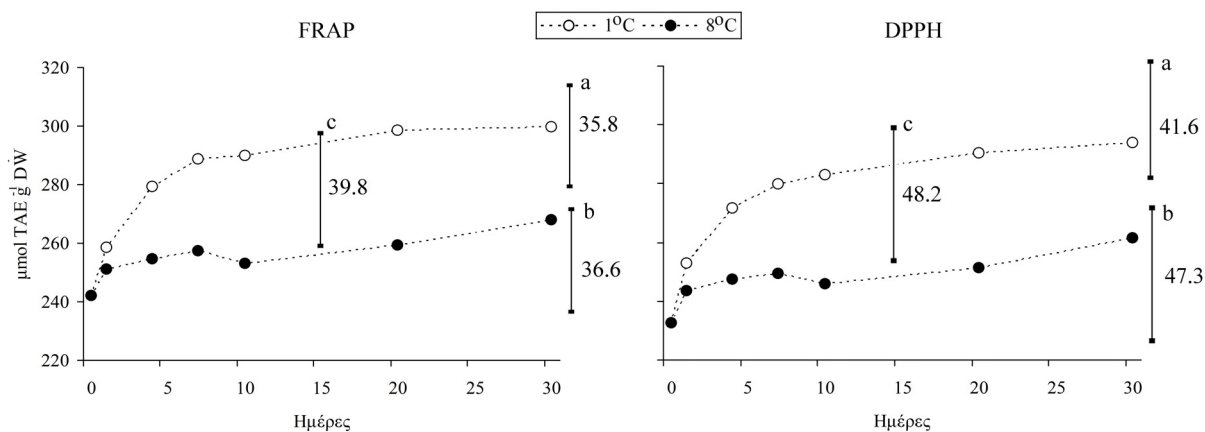
Πηγή παραλλακτικότητας	Μεταβλητή	
	Υγρασία	TP
<i>Pc</i> †	***	***
<i>Pt</i>	***	***
<i>Pd</i>	***	***
<i>Pc</i> × <i>t</i>	NS	***
<i>Pc</i> × <i>d</i>	***	*
<i>Pt</i> × <i>d</i>	***	***
<i>Pc</i> × <i>t</i> × <i>d</i>	NS	NS

† Από τρι-παραγοντική ANOVA (ποικιλία × χρόνος συντήρησης × αποξήρανση) περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα από την 0 d έως και την 20 d.

NS μη σημαντικό, \* σημαντικό  $P < 0,05$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .



**Γράφημα 3. 7.** Ολικά και μεμονωμένα φαινολικά στα νωπά σπέρματα καρδιάς ποικιλίας Franquette συντηρημένα στον 1°C ή στους 8°C έως 30 d, στο Πείραμα Γ. Οι κάθετες μπάρες αντιστοιχούν στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ . Μπάρα (a), από μόνο-παραγοντική ANOVA περιλαμβάνοντας όλες τις ημέρες συντήρησης στον 1°C; Μπάρα (b), από μόνο-παραγοντική ANOVA περιλαμβάνοντας όλες τις ημέρες συντήρησης στους 8°C; Μπάρα (c), από δι-παραγοντική ANOVA (χρόνος συντήρησης × θερμοκρασία) περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα από την 1 d έως την 30 d.



**Γράφημα 3. 8.** Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, εκτιμούμενη με τις μεθόδους FRAP και DPPH, στα νωπά σπέρματα καρδιάς ποικιλίας Franquette συντηρημένα στον 1° C ή στους 8° C έως 30 d, στο Πείραμα Γ. Οι κάθετες μπάρες αντιστοιχούν στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ . Μπάρα (a), από μόνο-παραγοντική ANOVA περιλαμβάνοντας όλες τις ημέρες συντήρησης στον 1° C; Μπάρα (b), από μόνο-παραγοντική ANOVA περιλαμβάνοντας όλες τις ημέρες συντήρησης στους 8° C; Μπάρα (c), από δι-παραγοντική ANOVA (χρόνος συντήρησης  $\times$  θερμοκρασία) περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα από την 1 d έως την 30 d.

**Πίνακας 3. 9.** Πιθανότητες των επιδράσεων του χρόνου συντήρησης ( $Pt$ ), της θερμοκρασίας ( $Pte$ ) και της αλληλεπίδρασης τους ( $Pt \times te$ ) επί των ολικών φαινολικών (TP), της αντιοξειδωτικής ικανότητας (εκτιμούμενη με τις μεθόδους FRAP και DPPH) και των μεμονωμένων φαινολικών (Γραφήματα 3.7, 3.8), στα νωπά σπέρματα καρδιάς ποικιλίας Franquette κατά τη συντήρηση, στο Πείραμα Γ.

ΠΠ†		Μεταβλητή††									
		TP	FRAP	DPPH	HB	DHB	PC	PCE	VA	SY	EL
$Pt$ †††	1° C	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
	8° C	NS	NS	NS	NS	***	NS	***	NS	***	NS
$Pt$ ††††		**	*	*	NS	***	**	***	NS	***	NS
$Pte$		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
$Pt \times te$		*	NS	NS	***	NS	NS	NS	**	**	***

† ΠΠ: πηγή παραλλακτικότητας.

†† HB: 4-υδοξυβενζοϊκό οξύ; DHB: 2,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ; PC: πρωτοκατεχικό οξύ; PCE: αιθυλεστέρας πρωτοκατεχικού; VA: βανιλικό οξύ; SY: συρινγικό οξύ; EL: ελλαγικό οξύ.

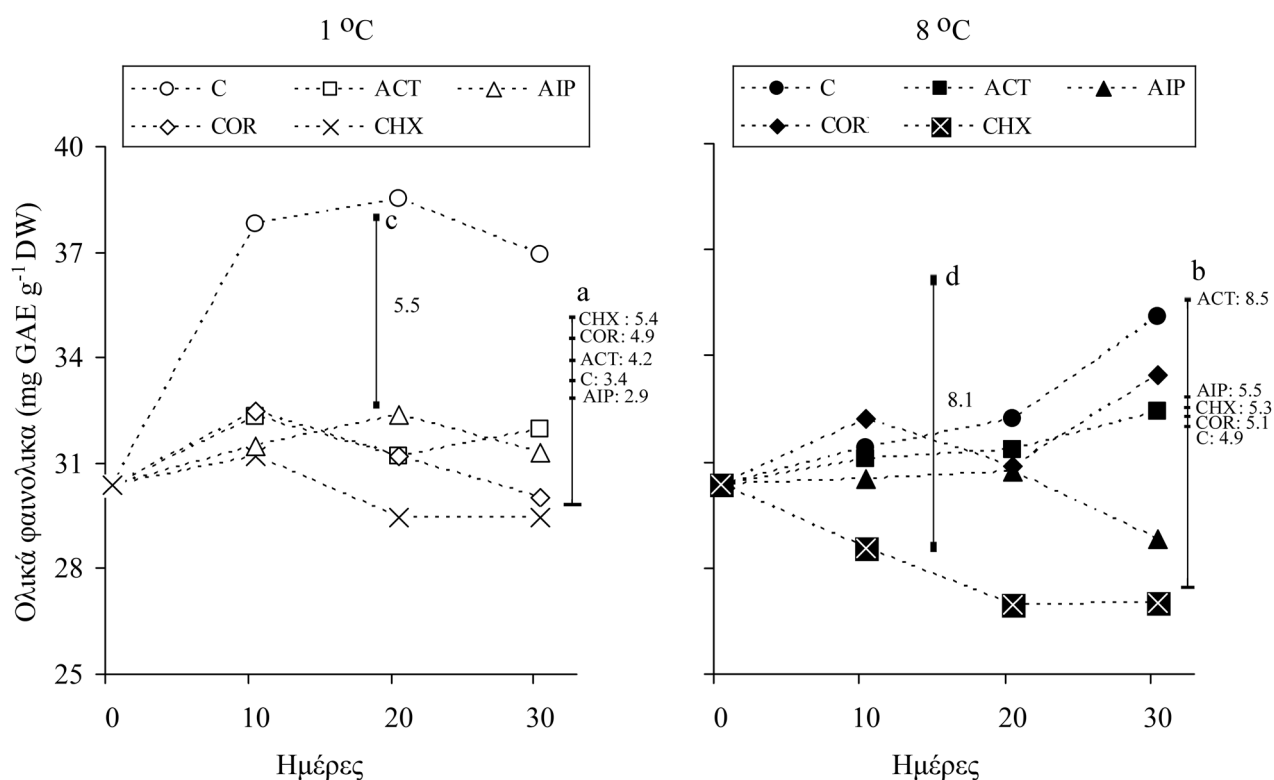
††† Πιθανότητες της επίδρασης του χρόνου συντήρησης από μόνο-παραγοντική ANOVA για την κάθε θερμοκρασία περιλαμβάνοντας όλες τις ημέρες συντήρησης.

†††† Πιθανότητες των επιδράσεων του χρόνου συντήρησης ( $Pt$ ), της θερμοκρασίας ( $Pte$ ) και της αλληλεπίδρασής τους ( $Pt \times te$ ) από δι-παραγοντική ANOVA περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα από την 1 d έως την 30 d.

NS μη σημαντικό, \* σημαντικό  $P < 0,05$ , \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .



Οι χειρισμοί με ACT, AIP, COR και CHX παρεμπόδισαν την αύξηση των TP στα νωπά σπέρματα συντηρούμενα στον 1° C (Γράφημα 3.9, Πίνακας 3.10). Κατά τη συντήρηση των σπερμάτων στους 8° C, δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές των επιπέδων TP στα σπέρματα που είχαν εμβλαπτιστεί στις τέσσερις ουσίες, όπως άλλωστε και στους μάρτυρες. Σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης στον 1° C, τα μέσα επίπεδα TP των μαρτύρων ήταν κατά 1,2-, 1,2-, 1,2- και 1,3-φορές υψηλότερα από των εμβλαπτισμένων σπερμάτων σε ACT, AIP, COR και CHX, αντίστοιχα.



**Γράφημα 3. 9.** Ολικά φαινολικά στα νωπά σπέρματα καρδιάς ποικιλίας Franquette εμβλαπτισμένα σε διάφορες ουσίες και συντηρημένα στον 1° C ή στους 8° C έως 30 d, την Πείραμα Γ. C, μάρτυρας; ACT, actinomycin D; AIP, 2-aminoindane-2-phosphonic acid; COR, cordycepin; CHX, cycloheximide. Οι κάθετες μπάρες αντιστοιχούν στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ . Μπάρα (a), από μόνο-παραγοντική ANOVA για κάθε χειρισμό περιλαμβάνοντας όλες τις ημέρες συντήρησης στον 1° C; Μπάρα (b), από μόνο-παραγοντική ANOVA για κάθε χειρισμό περιλαμβάνοντας όλες τις ημέρες συντήρησης στους 8° C; Μπάρα (c), από δι-παραγοντική ANOVA (χρόνος συντήρησης × χειρισμός) περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα από την 10 d έως την 30 d στον 1° C; Μπάρα (d), από δι-παραγοντική ANOVA (χρόνος συντήρησης × χειρισμός) περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα από την 10 d έως την 30 d στους 8° C; Η τρι-παραγοντική ANOVA (χρόνος συντήρησης × θερμοκρασία × χειρισμός) έδειξε την επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης και του χειρισμού ( $P < 0,001$ ) αλλά μη σημαντική του χρόνου συντήρησης ( $P > 0,05$ ), με τιμή  $HSD_{(0,05)} = 7,54$ .

**Πίνακας 3. 10.** Πιθανότητες των επιδράσεων του χρόνου συντήρησης (*Pt*), των χειρισμών (*Ptr*) και της αλληλεπίδρασης τους (*Pt × tr*) επί των ολικών φαινολικών (Γράφημα 3.9), στα νωπά σπέρματα καρδιάς ποικιλίας Franquette κατά τη συντήρηση, στο Πείραμα Γ.

Πηγή παραλλακτικότητας	Θερμοκρασία	
	1° C	8° C
<i>P<sub>C</sub></i> †	***	NS
<i>P<sub>ACT</sub></i>	NS	NS
<i>P<sub>AIP</sub></i>	NS	NS
<i>P<sub>COR</sub></i>	NS	NS
<i>P<sub>CHX</sub></i>	NS	NS
<i>Pt</i> ††	NS	NS
<i>Ptr</i>	***	NS
<i>Pt × tr</i>	NS	NS

† Πιθανότητες της επίδρασης του χρόνου συντήρησης από μόνο-παραγοντική ANOVA για τον κάθε συνδυασμό θερμοκρασίας και χειρισμού περιλαμβάνοντας όλες τις ημέρες συντήρησης; C: μάρτυρας; ACT: actinomycin D; AIP: 2-aminoindane-2-phosphonic acid; COR: cordycepin; CHX: cycloheximide.

†† Πιθανότητες των επιδράσεων του χρόνου συντήρησης (*Pt*), των χειρισμών (*Ptr*) και της αλληλεπίδρασής τους (*Pt × tr*) από δι-παραγοντική ANOVA για κάθε θερμοκρασία περιλαμβάνοντας όλα τα δεδομένα από την 1 d έως την 30 d.

NS μη σημαντικό, \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

Στα νωπά σπέρματα της ‘Franquette’ προσδιορίστηκαν τα φαινολικά οξέα HB, DHB, PC, VA, SY και EL, καθώς επίσης και ο PCE (Γράφημα 3.7). Πριν τη συντήρηση, οι συγκεντρώσεις των HB, DHB, PC, PCE, VA, SY και EL ήταν 124, 140, 316, 230, 282, 165 and 681  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW, αντίστοιχα.

Κατά τη συντήρηση στον 1° C, παρατηρήθηκαν σημαντικές αυξήσεις στις συγκεντρώσεις όλων των φαινολικών ουσιών, εκτός του PCE που μειώθηκε (Γράφημα 3.7, Πίνακας 3.9). Τα αυξημένα επίπεδα των DHB, PC και VA παρατηρήθηκαν από την τέταρτη ημέρα και παρέμειναν σταθερά μέχρι την τριακοστή μέρα, ενώ το HB αυξήθηκε από την τέταρτη ημέρα και συνέχισε να αυξάνεται μέχρι την τριακοστή. Αυξημένες συγκεντρώσεις SY και EL εμφανίστηκαν μετά την έβδομη ημέρα, ενώ τα επίπεδά και των δύο συνέχισαν να αυξάνονται ως την εικοστή, και παρέμειναν αμετάβλητα μέχρι το τέλος της συντήρησης. Οι μεγαλύτερες αυξήσεις που βρέθηκαν σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα των φαινολικών ουσιών ήταν κατά 1,5-, 1,5-, 1,3-, 1,4-, 1,8- και 1,1-φορές στα HB, DHB, PC, VA, SY και EL, αντίστοιχα, και εμφανίστηκαν χρονικά μεταξύ 10 και 30 d. Το PCE είχε πτωτική τάση κατά τη συντήρηση στον 1° C, εμφανίζοντας σημαντική μείωση την τριακοστή ημέρα, όπου η συγκέντρωσή του ήταν κατά 1,2-φορές χαμηλότερη σε σχέση με την αρχική.

Κατά τη συντήρηση στους 8° C, οι συγκεντρώσεις των DHB και SY αυξήθηκαν, η συγκέντρωση του PCE μειώθηκε, ενώ δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στις συγκεντρώσεις των υπόλοιπων φαινολικών ουσιών (Γράφημα 3.7, Πίνακας 3.9). Οι αυξήσεις στα DHB και SY εμφανίστηκαν από την έβδομη και εικοστή ημέρα, αντίστοιχα, ενώ το PCE ήταν μειωμένο από την δέκατη ημέρα και έπειτα. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις τόσο του DHB όσο και του SY βρέθηκαν την 20 d στους 8° C, όπου και οι δυο ουσίες ήταν κατά 1,4-φορές αυξημένες σε σχέση με την 0 d. Τα χαμηλότερα

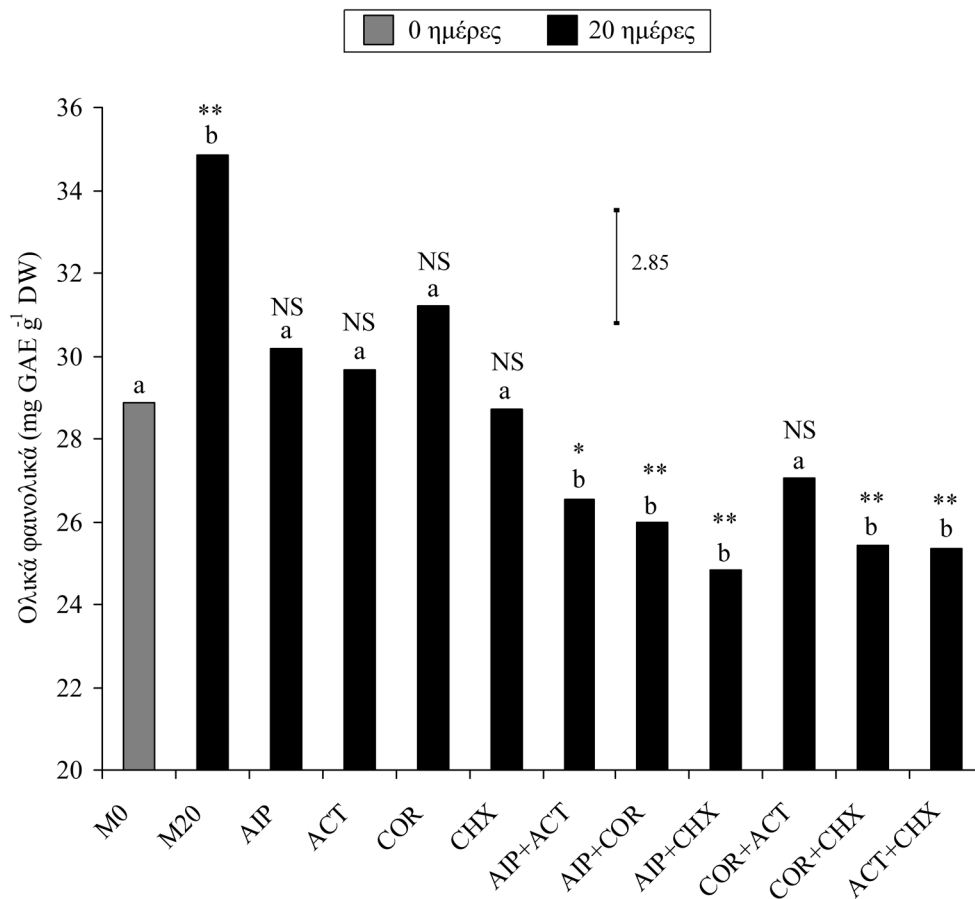
επίπεδα PCE που παρατηρήθηκαν την τριακοστή ημέρα ήταν κατά 1,4-φορές χαμηλότερα από την 0 d.

Η επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης στην συγκέντρωση όλων των φαινολικών ουσιών ήταν σημαντική (Πίνακας 3.9). Οι κύριες επιδράσεις για όλες τις ουσίες έδειξαν ότι τα σπέρματα που συντηρήθηκαν στον 1° C είχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις από τα σπέρματα στους 8° C. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν υψηλότερες, κατά μέσο όρο, συγκεντρώσεις καθ' όλη τη συντήρηση στον 1° C σε σχέση με τους 8° C κατά 1,1-, 1,1-, 1,1-, 1,2-, 1,5-, 1,2-και 1,1-φορές των HB, DHB, PC, PCE, VA, SY και EL, αντίστοιχα (Γράφημα 3.7). Οι διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων των φαινολικών ουσιών στον 1° C και τους 8° C είχαν τάση αύξησης με την πάροδο του χρόνου συντήρησης, και οι μέγιστες διαφορές παρατηρήθηκαν την εικοστή ημέρα, εκτός από το DHB όπου η διαφορά των αυξημένων συγκεντρώσεων στο χρόνο παρέμεινε σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης.

### **3.3.5.2. Πείραμα Δ**

#### ***Ολικά και μεμονωμένα φαινολικά***

Πριν τη συντήρηση στο Πείραμα Δ, στα νωπά σπέρματα της 'Franquette' τα TP ήταν ~29 mg GAE g<sup>-1</sup> DW (Γράφημα 3.10). Μετά από 20 d στον 1° C παρατηρήθηκε αύξηση των TP στους μάρτυρες κατά 1,2-φορές. Στα σπέρματα που είχαν δεχτεί επεμβάσεις με AIP, ACT, COR, CHX και COR+ACT τα TP ήταν στα ίδια επίπεδα με την 0 d. Σε όλους του υπόλοιπους συνδυασμούς ουσιών τα επίπεδα των TP ήταν μειωμένα σε σχέση με την 0 d. Την εικοστή ημέρα, στους μάρτυρες βρέθηκαν τα υψηλότερα επίπεδα TP, ακολουθούμενοι από τα σπέρματα που είχαν δεχτεί τις επεμβάσεις με AIP, ACT, COR και CHX, ενώ οι συνδυασμοί των τεσσάρων ουσιών ανά δύο οδήγησαν στα χαμηλότερα επίπεδα TP στα σπέρματα (Γράφημα 3.10, Πίνακας 3.11).



**Γράφημα 3. 10.** Ολικά φαινολικά στα νωπά σπέρματα καρδιάς ποικιλίας Franquette εμβαπτισμένα σε διάφορες παρεμποδιστικές ουσίες και συντηρημένα στον 1° C για 20 d, την Πείραμα Δ. M, μάρτυρας; ACT, actinomycin D; AIP, 2-aminoindane-2-phosphonic acid; COR, cordycepin; CHX, cycloheximide. Πάνω από κάθε στήλη δίνονται οι πιθανότητες και οι συγκρίσεις των μέσων από την μόνο-παραγοντική ANOVA για κάθε εμβάπτιση περιλαμβάνοντας τις ημέρες συντήρησης 0 και 20 d. Η κάθετη μπάρα αντιστοιχεί στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$  από μόνο-παραγοντική ANOVA για όλες τις εμβάπτισεις την 20 d. NS μη σημαντικό, \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

Πριν τη συντήρηση στο Πείραμα Δ, στα νωπά σπέρματα της 'Franquette' το HB ήταν  $\sim 140 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$  (Γράφημα 3.11). Μετά από 20 d στον 1° C παρατηρήθηκε αύξηση του HB στους μάρτυρες κατά 1,5-φορές. Αυξήσεις του HB παρατηρήθηκαν στα σπέρματα που είχαν δεχτεί επεμβάσεις με ACT, COR,

CHX, COR+CHX και ACT+CHX. Αντίθετα η επέμβαση με AIP οδήγησε σε μειωμένη

**Πίνακας 3. 11.** Πιθανότητες της επίδρασης των χειρισμών (*P<sub>tr</sub>*) επί των ολικών και μεμονομένων φαινολικών (Γράφηματα 3.10-3.17), στα νωπά σπέρματα καρδιάς ποικιλίας Franquette κατά την 20 d συντήρησης, στο Πείραμα Δ.

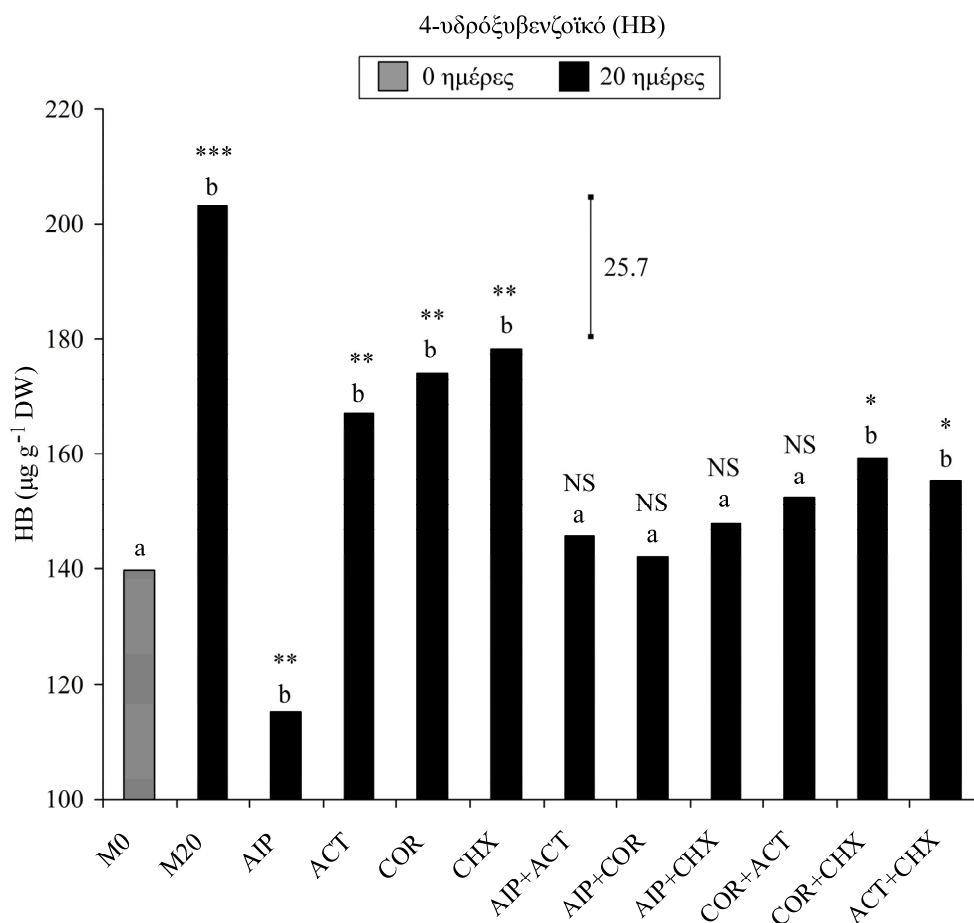
ΠΠ †	Μεταβλητή †							
	TP	HB	DHB	PC	PCE	VA	SY	EL
<i>P<sub>tr</sub></i> ††	***	***	***	***	*	***	***	***

† ΠΠ: πηγή παραλλακτικότητας; TP: ολικά φαινολικά; HB: 4-υδοξυβενζοϊκό οξύ; DHB: 2,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ; PC: πρωτοκατεχικό οξύ; PCE: αιθυλεστερας πρωτοκατεχικού; VA: βανιλικό οξύ; SY: συρινγικό οξύ; EL: ελλαγικό οξύ.

†† Πιθανότητες της επίδρασης των χειρισμών (*P<sub>tr</sub>*) από μόνο-παραγοντική ANOVA για όλες τις επεμβάσεις την 20 d.

NS μη σημαντικό, \* σημαντικό  $P < 0,05$ , \*\*\* Σημαντικό  $P < 0,001$ .

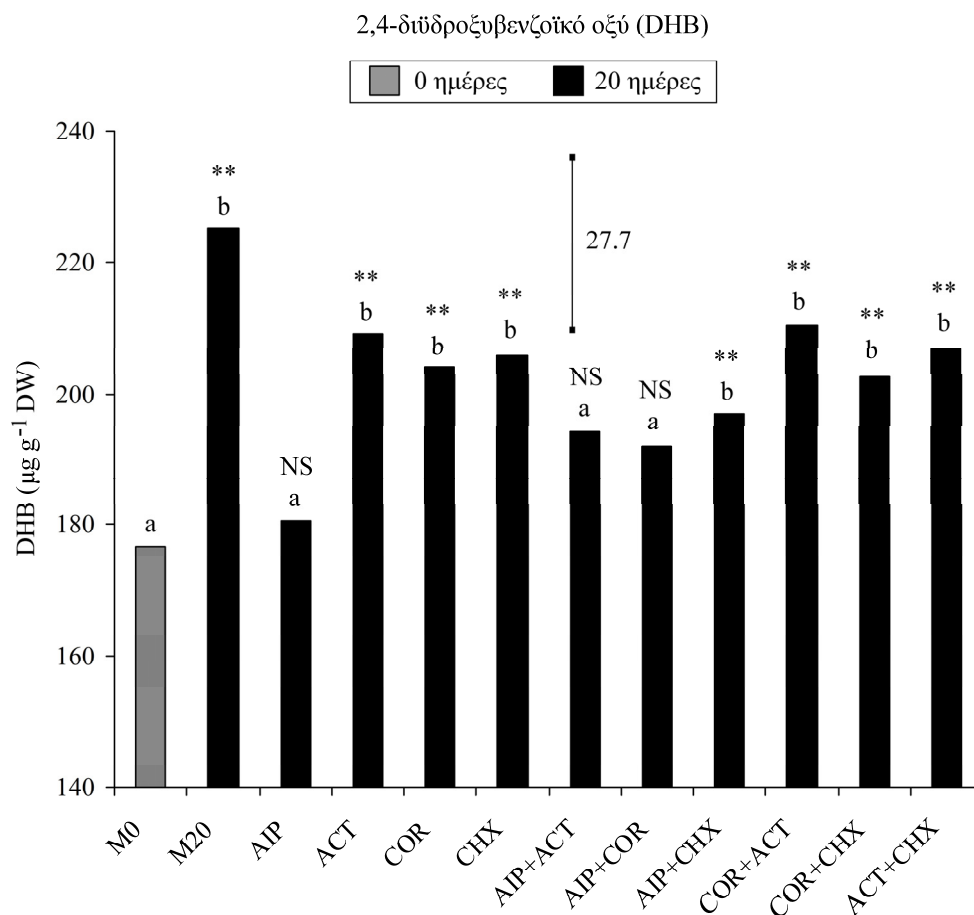
συγκέντρωση HB, ενώ στα σπέρματα που είχαν δεχτεί επεμβάσεις με AIP+ACT, AIP+COR, AIP+CHX και COR+ACT το HB ήταν στα ίδια επίπεδα με την 0 d. Την εικοστή ημέρα, στους μάρτυρες βρέθηκαν τα υψηλότερα επίπεδα HB ενώ στα σπέρματα που είχαν εμβαπτιστεί σε AIP τα χαμηλότερα (Γράφημα 3.11, Πίνακας 3.11). Στις υπόλοιπες επεμβάσεις, με μικρές διαφορές μεταξύ τους, βρέθηκαν ενδιάμεσα επίπεδα HB.



**Γράφημα 3. 11.** Συγκέντρωση 4-υδρόξυβενζοϊκού οξέως (HB) στα νωπά σπέρματα καρυδιάς ποικιλίας Franquette εμβαπτισμένα σε διάφορες παρεμποδιστικές ουσίες και συντηρημένα στον 1° C για 20 d, στο Πείραμα Δ. Μ, μάρτυρας; ACT, actinomycin D; AIP, 2-aminoindane-2-phosphonic acid; COR, cordycepin; CHX, cycloheximide. Πάνω από κάθε στήλη δίνονται οι πιθανότητες και οι συγκρίσεις των μέσων από την μόνο-παραγοντική ANOVA για κάθε εμβάπτιση περιλαμβάνοντας τις ημέρες συντήρησης 0 και 20 d. Η κάθετη μπάρα αντιστοιχεί στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$  από μόνο-παραγοντική ANOVA για όλες τις επεμβάσεις την 20 d. NS μη σημαντικό, \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

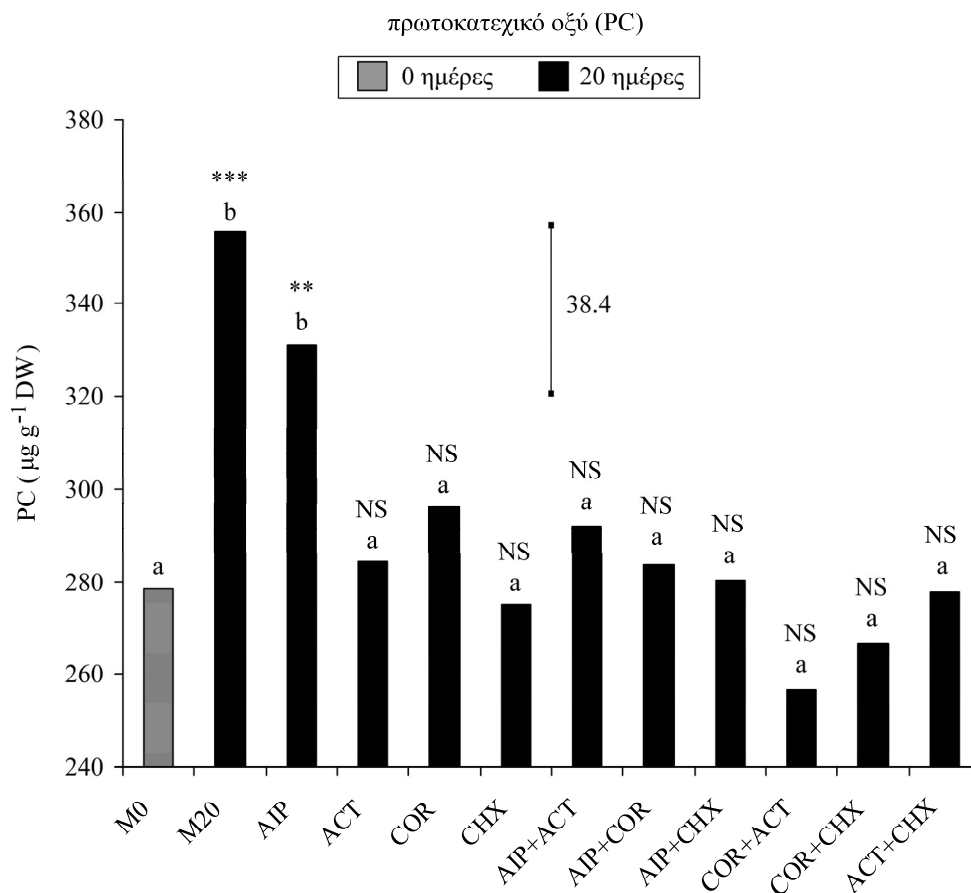
Περιεκτικότητα σε DHB  $\sim 177 \mu\text{g g}^{-1}$  DW παρατηρήθηκε πριν τη συντήρηση των νωπών σπερμάτων της 'Franquette' (Γράφημα 3.12). Μετά από 20 d στον 1° C παρατηρήθηκε αύξηση του DHB στους μάρτυρες κατά  $\sim 1,3$ -φορές. Μικρότερες αυξήσεις του DHB (κατά  $\sim 1,1$ - $1,2$ -φορές) παρατηρήθηκαν στα σπέρματα που είχαν δεχτεί τις υπόλοιπες επεμβάσεις, πλην των επεμβάσεων με AIP, AIP+ACT και AIP+COR στις οποίες τα επίπεδα του DHB ήταν παρόμοια με τα αρχικά. Την εικοστή ημέρα, στους μάρτυρες βρέθηκαν τα υψηλότερα επίπεδα DHB ενώ στα σπέρματα που είχαν εμβαπτιστεί σε AIP τα χαμηλότερα (Γράφημα

3.12, Πίνακας 3.11). Στις υπόλοιπες επεμβάσεις, με μικρές διαφορές μεταξύ τους, βρέθηκαν ενδιάμεσα επίπεδα DHB.



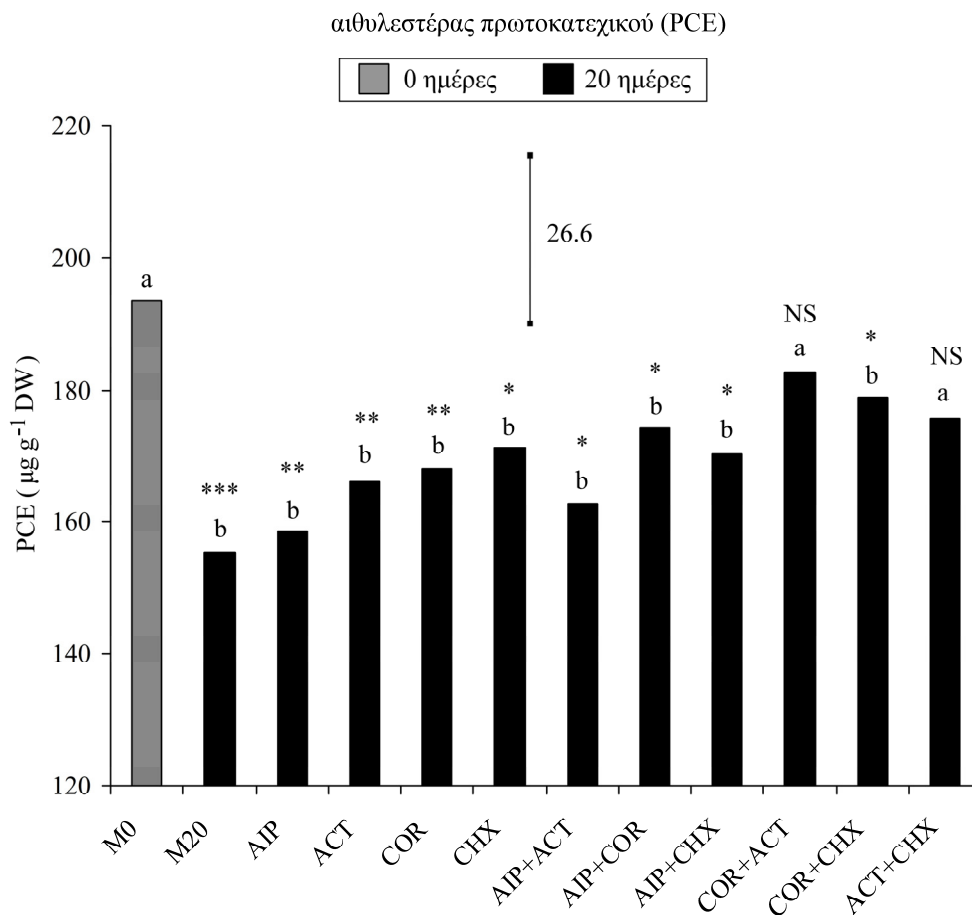
**Γράφημα 3. 12.** Συγκέντρωση 2,4-διϋδροξυβενζοϊκού οξέως (DHB) στα νωπά σπέρματα καρδιάς ποικιλίας Franquette εμβαπτισμένα σε διάφορες παρεμποδιστικές ουσίες και συντηρημένα στον 1° C για 20 d, στο Πείραμα Δ. Μ, μάρτυρας; ACT, actinomycin D; AIP, 2-aminoindane-2-phosphonic acid; COR, cordycepin; CHX, cycloheximide. Πάνω από κάθε στήλη δίνονται οι πιθανότητες και οι συγκρίσεις των μέσων από την μόνο-παραγοντική ANOVA για κάθε εμβάπτιση περιλαμβάνοντας τις ημέρες συντήρησης 0 και 20 d. Η κάθετη μπάρα αντιστοιχεί στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$  από μόνο-παραγοντική ANOVA για όλες τις επεμβάσεις την 20 d. NS μη σημαντικό, \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

Αρχικά, στα νωπά σπέρματα της ‘Franquette’ το PC ήταν  $\sim 278 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$ , ενώ μετά από 20 d στον 1° C παρατηρήθηκε αύξηση του PC στους μάρτυρες κατά  $\sim 1,3$ -φορές, και στα σπέρματα που είχαν εμβαπτιστεί σε AIP κατά  $\sim 1,2$ -φορές (Γράφημα 3.13). Σε όλες τις υπόλοιπες επεμβάσεις τα επίπεδα του PC ήταν παρόμοια με τα αρχικά. Την εικοστή ημέρα, στους μάρτυρες και την επέμβαση με AIP βρέθηκαν τα υψηλότερα επίπεδα PC, ενώ στα σπέρματα που είχαν εμβαπτιστεί στις υπόλοιπες ουσίες και όλους τους συνδυασμούς ουσιών βρέθηκαν ενδιάμεσα επίπεδα HB, με μικρές διαφορές μεταξύ τους (Γράφημα 3.13, Πίνακας 3.11).



**Γράφημα 3. 13.** Συγκέντρωση πρωτοκατεχικού οξέως (PC) στα νωπά σπέρματα καρδιάς ποικιλίας Franquette εμβλαπτισμένα σε διάφορες παρεμποδιστικές ουσίες και συντηρημένα στον 1° C για 20 d, στο Πείραμα Δ. M, μάρτυρας; ACT, actinomycin D; AIP, 2-aminoindane-2-phosphonic acid; COR, cordycepin; CHX, cycloheximide. Πάνω από κάθε στήλη δίνονται οι πιθανότητες και οι συγκρίσεις των μέσων από την μόνο-παραγοντική ANOVA για κάθε εμβάπτιση περιλαμβάνοντας τις ημέρες συντήρησης 0 και 20 d. Η κάθετη μπάρα αντιστοιχεί στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$  από μόνο-παραγοντική ANOVA για όλες τις επεμβάσεις την 20 d. NS μη σημαντικό, \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

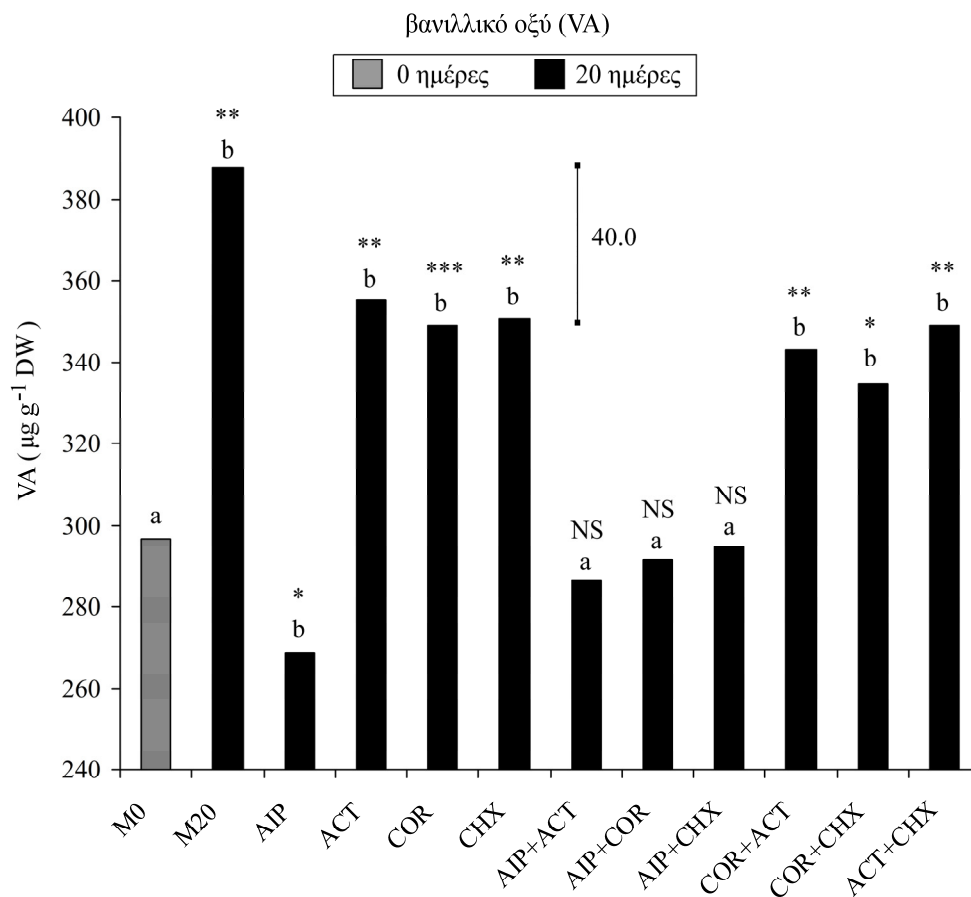
Τα αρχικά επίπεδα του PCE των σπερμάτων ήταν  $\sim 194 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$  (Γράφημα 3.14). Το PCE μειώθηκε κατά τη συντήρηση στα σπέρματα όλων των επεμβάσεων πλην των COR+ACT, COR+CHX και ACT+CHX. Την εικοστή ημέρα οι μάρτυρες είχαν τη χαμηλότερη συγκέντρωση PCE η οποία όμως διέφερε σημαντικά μόνο από την επέμβαση COR+ACT.



**Γράφημα 3. 14.** Συγκέντρωση αιθυλεστέρας πρωτοκατεχικού οξέως (PCE) στα νωπά σπέρματα καρδιάς ποικιλίας Franquette εμβλαπτισμένα σε διάφορες παρεμποδιστικές ουσίες και συντηρημένα στον 1° C για 20 d, στο Πείραμα Δ. Μ, μάρτυρας; ACT, actinomycin D; AIP, 2-aminoindane-2-phosphonic acid; COR, cordycepin; CHX, cycloheximide. Πάνω από κάθε στήλη δίνονται οι πιθανότητες και οι συγκρίσεις των μέσων από την μόνο-παραγοντική ANOVA για κάθε εμβάπτιση περιλαμβάνοντας τις ημέρες συντήρησης 0 και 20 d. Η κάθετη μπάρα αντιστοιχεί στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$  από μόνο-παραγοντική ANOVA για όλες τις επεμβάσεις την 20 d. NS μη σημαντικό, \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

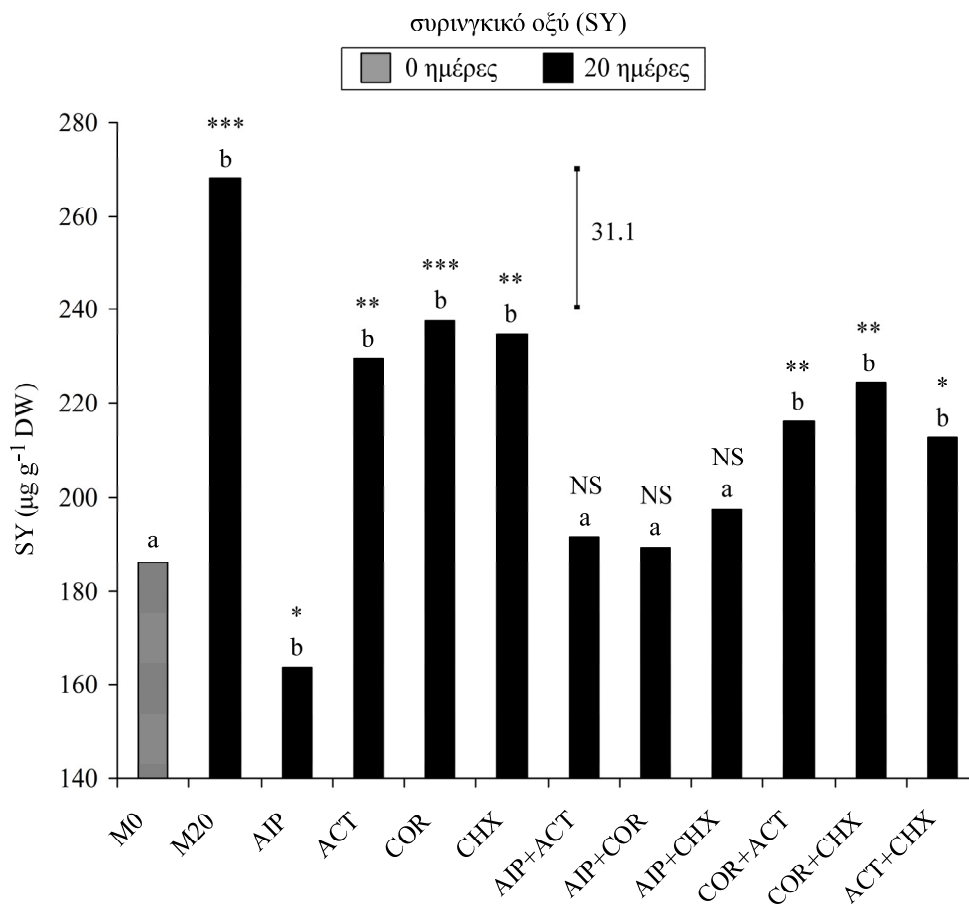
Πριν τη συντήρηση στα νωπά σπέρματα το VA ήταν  $\sim 296 \mu\text{g g}^{-1}$  DW (Γράφημα 3.15). Μετά από 20 d στον 1° C παρατηρήθηκε αύξηση του VA στους μάρτυρες κατά  $\sim 1,3$ -φορές. Αυξήσεις του VA παρατηρήθηκαν και στα σπέρματα που είχαν δεχτεί επεμβάσεις με ACT, COR, CHX, και τους συνδυασμούς τους οι οποίες ήταν της τάξεως των  $\sim 1,2$ -φορών. Αντίθετα, η επέμβαση με AIP οδήγησε σε μειωμένη συγκέντρωση VA, ενώ στα σπέρματα που είχαν δεχτεί επεμβάσεις με AIP+ACT, AIP+COR και AIP+CHX το VA ήταν στα ίδια επίπεδα με την 0 d. Την εικοστή ημέρα, στους μάρτυρες βρέθηκαν τα υψηλότερα επίπεδα VA, ενώ τα χαμηλότερα στα σπέρματα που είχαν εμβλαπτιστεί μόνο σε AIP και στους συνδυασμούς της με τις άλλες τρεις ουσίες (Γράφημα 3.15, Πίνακας 3.11). Στις υπόλοιπες επεμβάσεις, με μικρές διαφορές μεταξύ τους, βρέθηκαν ενδιάμεσα επίπεδα VA.





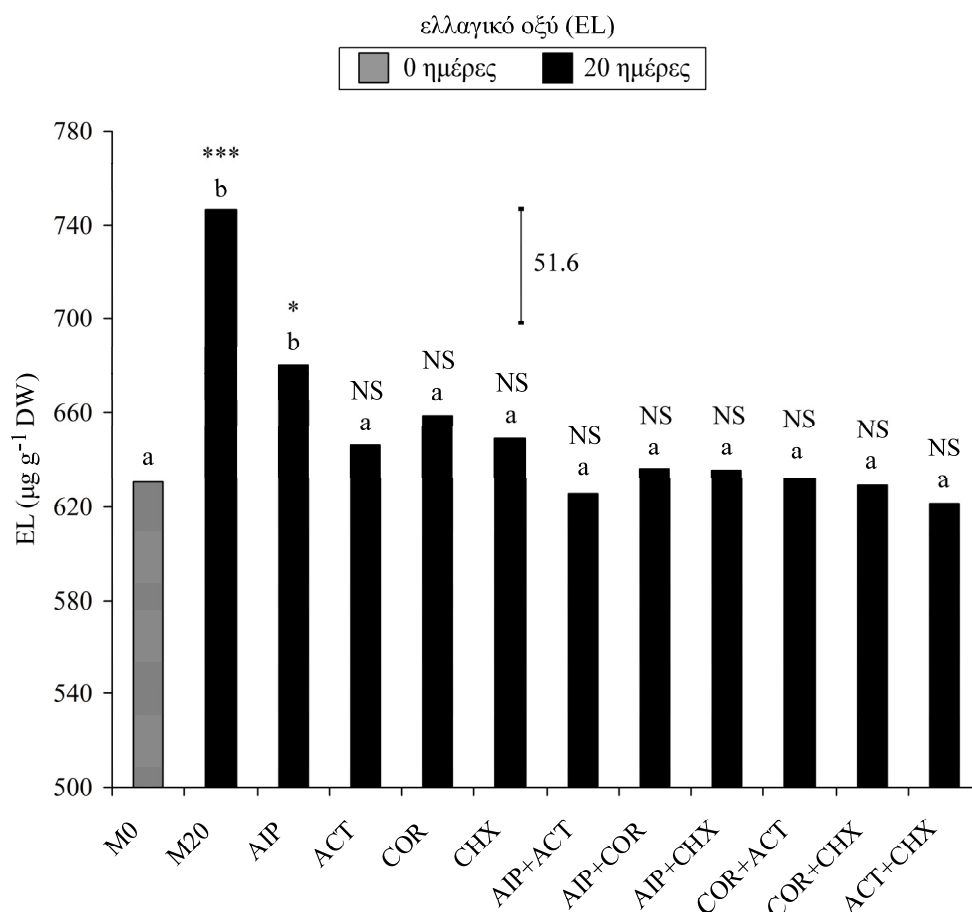
**Γράφημα 3. 15.** Συγκέντρωση βανιλλικού οξέως (VA) στα νωπά σπέρματα καρυδιάς ποικιλίας Franquette εμβαπτισμένα σε διάφορες παρεμποδιστικές ουσίες και συντηρημένα στον 1° C για 20 d, στο Πείραμα Δ. M, μάρτυρας; ACT, actinomycin D; AIP, 2-aminoindane-2-phosphonic acid; COR, cordycepin; CHX, cycloheximide. Πάνω από κάθε στήλη δίνονται οι πιθανότητες και οι συγκρίσεις των μέσων από την μόνο-παραγοντική ANOVA για κάθε εμβάπτιση περιλαμβάνοντας τις ημέρες συντήρησης 0 και 20 d. Η κάθετη μπάρα αντιστοιχεί στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$  από μόνο-παραγοντική ANOVA για όλες τις επεμβάσεις την 20 d. NS μη σημαντικό, \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

Πριν τη συντήρηση στα νωπά σπέρματα το SY ήταν  $\sim 186 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$  (Γράφημα 3.16). Μετά από 20 d στον 1° C παρατηρήθηκε αύξηση του SY στους μάρτυρες κατά  $\sim 1,4$ -φορές. Αυξήσεις του SY παρατηρήθηκαν στα σπέρματα που είχαν δεχτεί επεμβάσεις με ACT, COR, CHX, και τους συνδυασμούς τους οι οποίες ήταν της τάξεως των  $\sim 1,1$ - $1,3$ -φορών. Αντίθετα η επέμβαση με AIP οδήγησε σε μειωμένη συγκέντρωση SY, ενώ στα σπέρματα που είχαν δεχτεί επεμβάσεις με AIP+ACT, AIP+COR και AIP+CHX το SY ήταν στα ίδια επίπεδα με την 0 d. Την εικοστή ημέρα, στους μάρτυρες βρέθηκαν τα υψηλότερα επίπεδα SY, ακολουθούμενα από αυτά των επεμβάσεων με ACT, COR και CHX (Γράφημα 3.16, Πίνακας 3.11). Συνοπτικά, τις παραπάνω επεμβάσεις ακολούθησαν οι συνδυασμοί των ACT, COR και CHX, ενώ τα χαμηλότερα επίπεδα SY βρέθηκαν στα σπέρματα που είχαν εμβαπτιστεί σε AIP και τους συνδυασμούς της.



**Γράφημα 3. 16.** Συγκέντρωση συριγγικού οξέως (SY) στα νωπά σπέρματα καρυδιάς ποικιλίας Franquette εμβαπτισμένα σε διάφορες παρεμποδιστικές ουσίες και συντηρημένα στον 1° C για 20 d, στο Πείραμα Δ. M, μάρτυρας; ACT, actinomycin D; AIP, 2-aminoindane-2-phosphonic acid; COR, cordycepin; CHX, cycloheximide. Πάνω από κάθε στήλη δίνονται οι πιθανότητες και οι συγκρίσεις των μέσων από την μόνο-παραγοντική ANOVA για κάθε εμβάπτιση περιλαμβάνοντας τις ημέρες συντήρησης 0 και 20 d. Η κάθετη μπάρα αντιστοιχεί στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$  από μόνο-παραγοντική ANOVA για όλες τις επεμβάσεις την 20 d. NS μη σημαντικό, \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

Αρχικά, στα νωπά σπέρματα της ‘Franquette’ το EL ήταν  $\sim 630 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$ , ενώ μετά από 20 d στον 1° C παρατηρήθηκε αύξηση του EL στους μάρτυρες κατά  $\sim 1,2$ -φορές και στα σπέρματα που είχαν εμβαπτιστεί σε AIP κατά  $\sim 1,1$ -φορές (Γράφημα 3.17). Σε όλες τις υπόλοιπες επεμβάσεις τα επίπεδα του EL ήταν παρόμοια με τα αρχικά. Την εικοστή ημέρα, τα υψηλότερα επίπεδα EL βρέθηκαν στους μάρτυρες, στην επέμβαση με AIP ενδιάμεσα, ενώ στα σπέρματα που είχαν εμβαπτιστεί στις υπόλοιπες ουσίες και τους συνδυασμούς τους βρέθηκαν τα χαμηλότερα επίπεδα EL (Γράφημα 3.17, Πίνακας 3.11). Η επέμβαση με AIP διέφερε σημαντικά, εκτός από τους μάρτυρες, και με τις επεμβάσεις AIP+ACT και ACT+CHX.



**Γράφημα 3. 17.** Συγκέντρωση ελλαγακικού οξέως (EL) στα νωπά σπέρματα καρδιάς ποικιλίας Franquette εμβλαπτισμένα σε διάφορες παρεμποδιστικές ουσίες και συντηρημένα στον 1° C για 20 d, στο Πείραμα Δ. M, μάρτυρας; ACT, actinomycin D; AIP, 2-aminoindane-2-phosphonic acid; COR, cordycepin; CHX, cycloheximide. Πάνω από κάθε στήλη δίνονται οι πιθανότητες και οι συγκρίσεις των μέσων από την μόνο-παραγοντική ANOVA για κάθε εμβάπτιση περιλαμβάνοντας τις ημέρες συντήρησης 0 και 20 d. Η κάθετη μπάρα αντιστοιχεί στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$  από μόνο-παραγοντική ANOVA για όλες τις επεμβάσεις την 20 d. NS μη σημαντικό, \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

### Ενεργότητες ενζύμων

Πριν τη συντήρηση στο Πείραμα Δ, στα νωπά σπέρματα της ‘Franquette’ η ειδική και ολική ενεργότητα της PAL ήταν  $\sim 1,4$   $\mu\text{mol}$  κινναμικού οξέως  $\text{mg}^{-1}$  πρωτεΐνης  $\text{h}^{-1}$  και  $\sim 5,7$   $\mu\text{mol}$  κινναμικού οξέως  $\text{g}^{-1}$  DW  $\text{h}^{-1}$ , αντίστοιχα (Γράφημα 3.18). Μετά από 20 d στον 1° C παρατηρήθηκε δραματική αύξηση των ενεργοτήτων της PAL στους μάρτυρες, κατά 2,3- και 3,4-φορές της ειδικής και ολικής, αντίστοιχα. Στα σπέρματα που είχαν δεχτεί επεμβάσεις με AIP, μόνη της ή σε συνδυασμό με τις άλλες ουσίες, οι ενεργότητες της PAL ήταν μειωμένες σε σχέση με τις αρχικές. Μάλιστα σε όλες τις επεμβάσεις που συμμετείχε η AIP οι τιμές των ενεργοτήτων της PAL ήταν παρόμοιες, και ήταν  $\sim 0,5$   $\mu\text{mol}$  κινναμικού οξέως  $\text{mg}^{-1}$  πρωτεΐνης  $\text{h}^{-1}$  για την ειδική και  $\sim 2$   $\mu\text{mol}$  κινναμικού οξέως  $\text{g}^{-1}$  DW  $\text{h}^{-1}$  για την ολική. Η ειδική ενεργότητα της PAL εμφανίστηκε αυξημένη και στα σπέρματα που είχαν δεχτεί τις επεμβάσεις με ACT, COR, CHX, COR+ACT, COR+CHX και ACT+CHX κατά 1,5-, 1,3-,

1,5-, 1,1-, 1,2- και 1,2-φορές, αντίστοιχα. Την εικοστή ημέρα η υψηλότερη ειδική ενεργότητα της PAL εμφανίστηκε στους μάρτυρες ακολουθούμενη από επεμβάσεις με ACT, COR και CHX (Γράφημα 3.18, Πίνακας 3.12).

Οι συνδυασμοί των τριών τελευταίων ουσιών έδωσαν ακόμα χαμηλότερη ειδική ενεργότητα της PAL, ενώ οι χαμηλότερες τιμές ήταν στις επεμβάσεις που συμμετείχε η AIP. Σε σχέση με την 0 d,

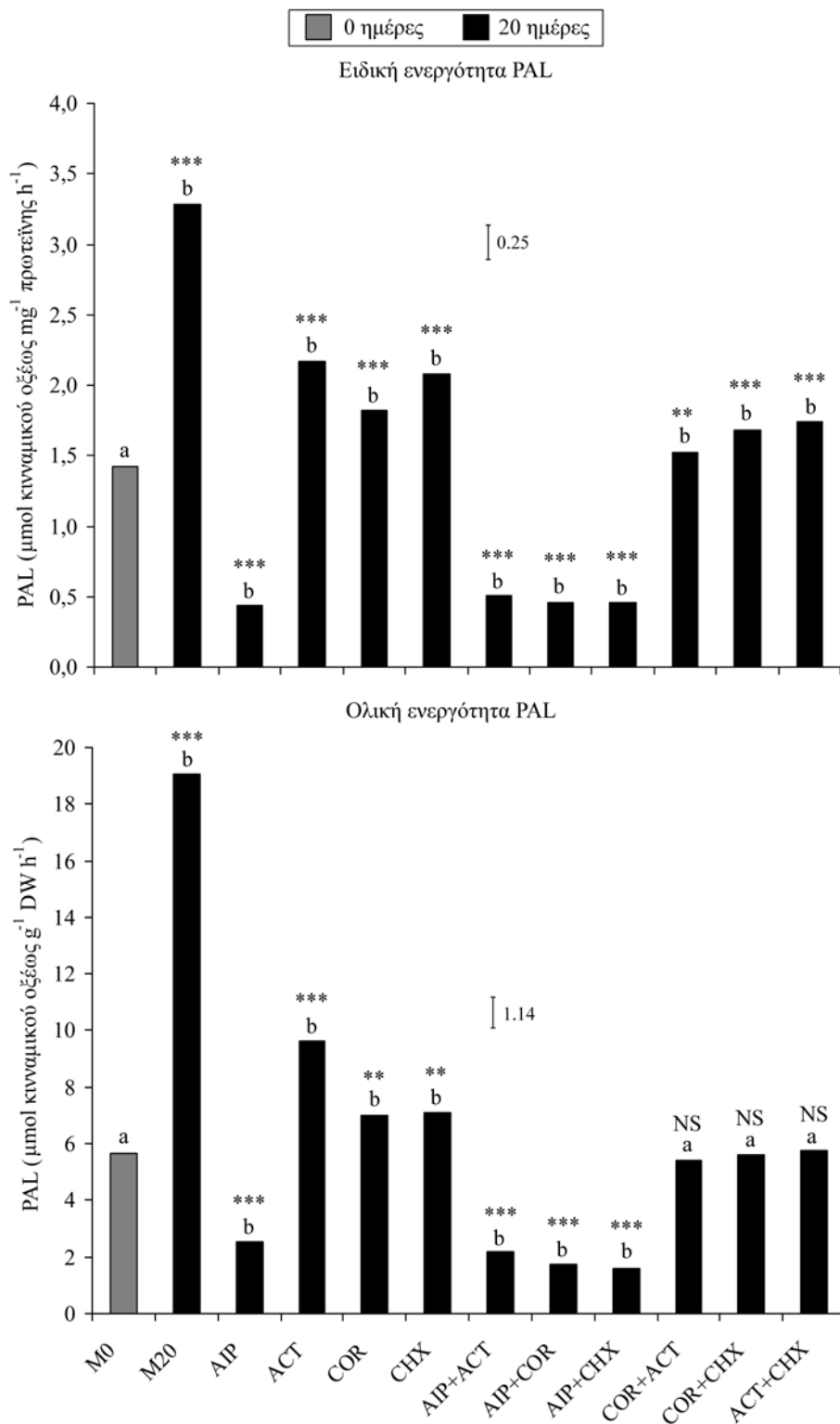
αυξημένη ολική ενεργότητα της PAL στις επεμβάσεις με ACT (κατά 1,2-φορές), COR (κατά 1,2-φορές), CHX (κατά 1,2-φορές) βρέθηκε την εικοστή ημέρα, ενώ στους συνδυασμούς των ουσιών αυτών δεν παρατηρήθηκαν διαφορές σε σχέση με την 0 d. Την εικοστή ημέρα, οι τιμές της ολικής ενεργότητας της PAL στις διάφορες επεμβάσεις ήταν σε φθίνουσα σειρά Μάρτυρας > ACT, COR, CHX > COR+ACT, COR+CHX, ACT+CHX > AIP, AIP+ACT, AIP+COR, AIP+CHX (Γράφημα 3.18, Πίνακας 3.12).

**Πίνακας 3. 12.** Πιθανότητες της επίδρασης των χειρισμών (*Ptr*) επί των ενεργοτήτων των ενζύμων φαινυλαλανίνη-αμμωνία λυάση (PAL), πολυφαινόλ-οξειδάση (PPO) και υπεροξειδάση (POD) (Γραφήματα 3.18-3.20), στα νωπά σπέρματα της ποικιλίας Franquette κατά την 20 d συντήρησης στον 1° C την 3η Π.

Πηγή παραλλακτικότητας	Μεταβλητή					
	PAL		PPO		POD	
	EE <sup>†</sup>	ΟΛΕ <sup>†</sup>	EE <sup>†</sup>	ΟΛΕ	EE <sup>†</sup>	ΟΛΕ
<i>Ptr</i>	***	***	***	***	***	***

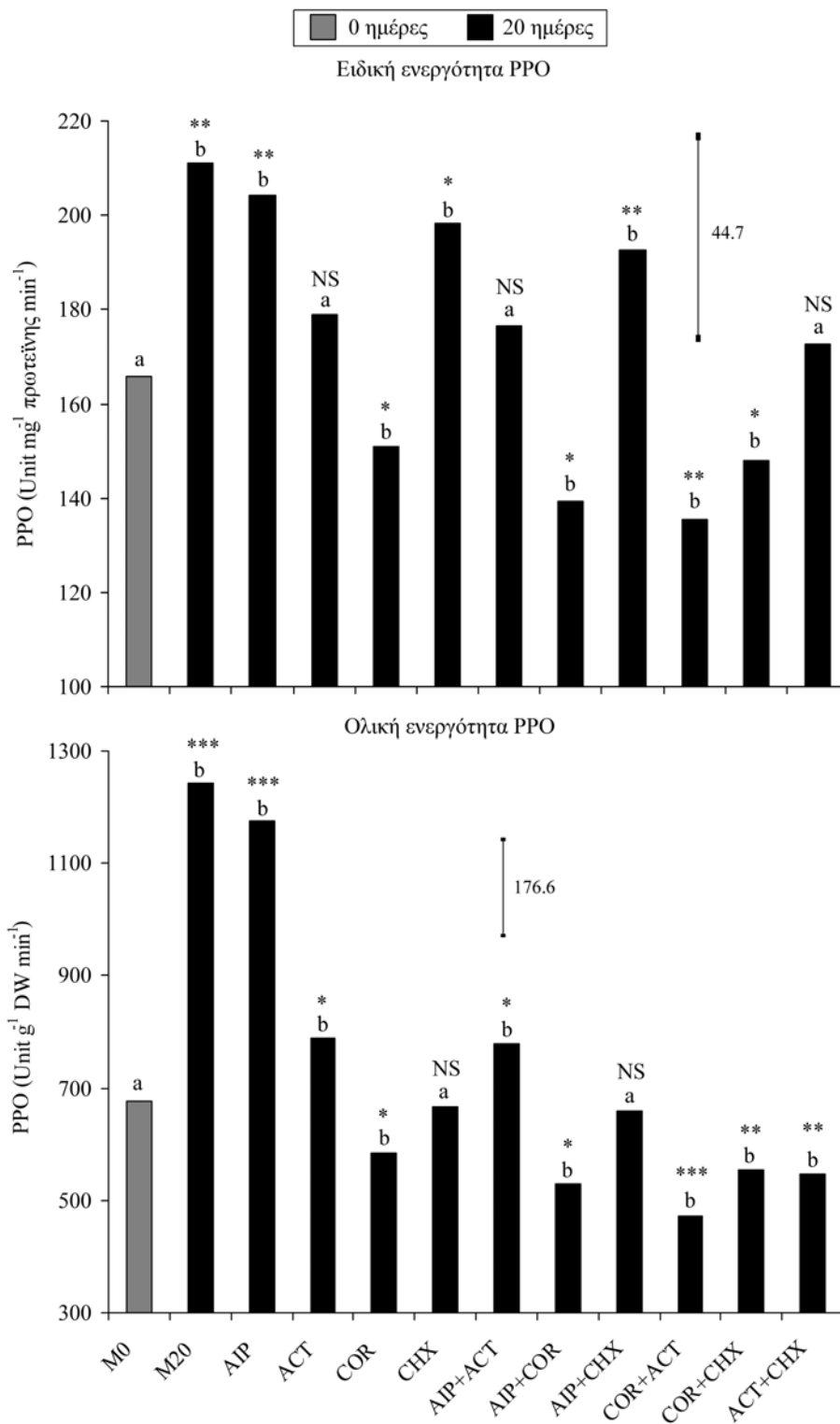
† EE: ειδική ενεργότητα, ΟΛΕ: ολική ενεργότητα.

\*\*\* Σημαντικό  $P < 0.001$ .



**Γράφημα 3. 18.** Ειδική και ολική ενεργότητα του ενζύμου φαινυλαλανίνη-αμμωνία λυάση (PAL) στα νοπά σπέρματα καρυδιών ποικιλίας Franquette εμβαπτισμένα σε διάφορες παρεμποδιστικές ουσίες και συντηρημένα στον 1°C για 20 d, στο Πείραμα Δ. M, μάρτυρας; ACT, actinomycin D; AIP, 2-aminoindane-2-phosphonic acid; COR, cordycepin; CHX, cycloheximide. Πάνω από κάθε στήλη δίνονται οι πιθανότητες και οι συγκρίσεις των μέσων από την μόνο-παραγοντική ANOVA για κάθε εμβάπτιση περιλαμβάνοντας τις ημέρες συντήρησης 0 και 20 d. Οι κάθετες μπάρες αντιστοιχούν στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$  από μόνο-παραγοντική ANOVA για όλες τις επεμβάσεις την 20 d. NS μη σημαντικό, \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

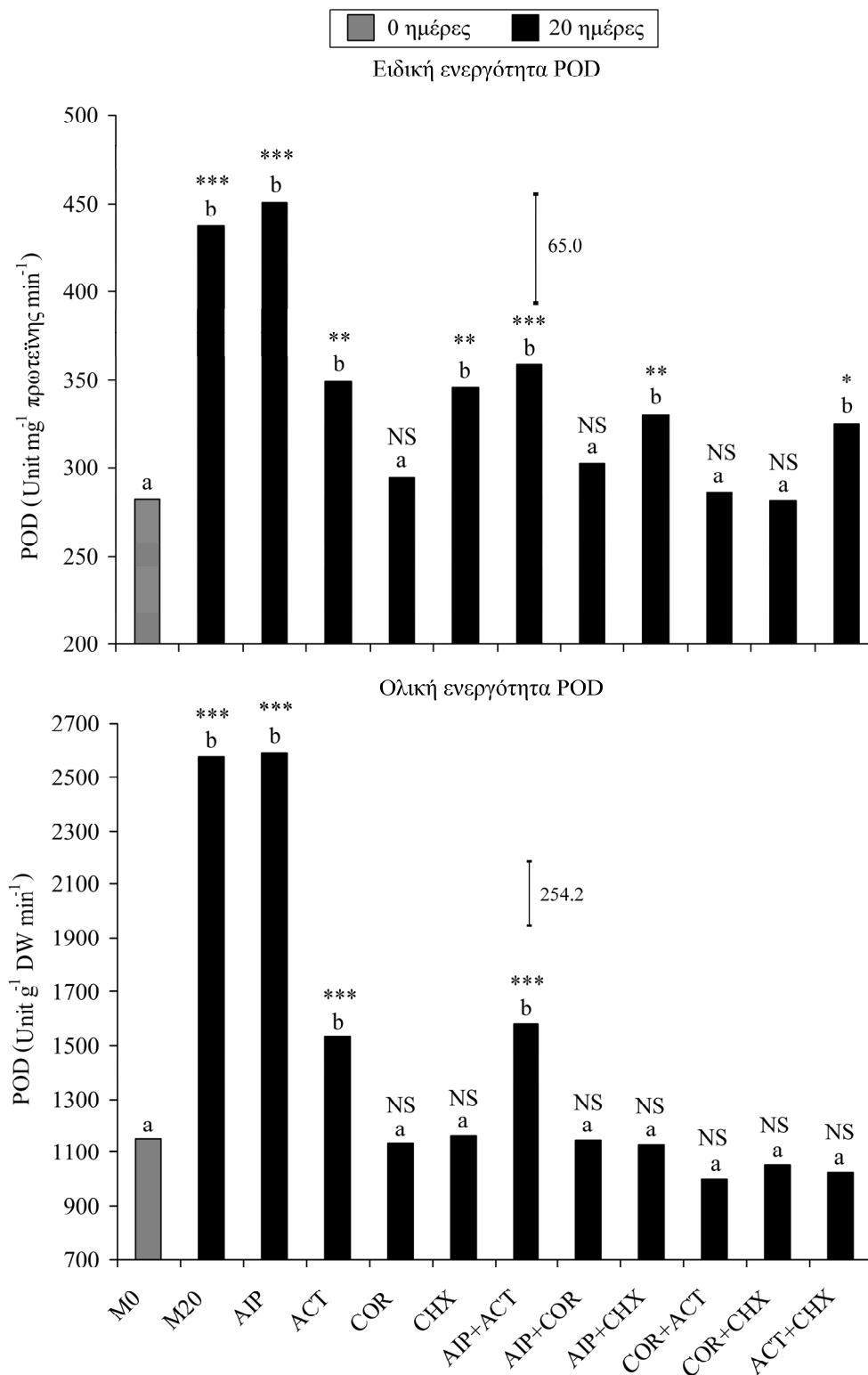
Πριν τη συντήρηση στο Πείραμα Δ, στα νωπά σπέρματα της Franquette η ειδική και ολική ενεργότητα της PPO ήταν  $\sim 166 \text{ Units mg}^{-1} \text{ πρωτεΐνης min}^{-1}$  και  $\sim 676 \text{ Units g}^{-1} \text{ DW min}^{-1}$ , αντίστοιχα (Γράφημα 3.19). Μετά από 20 d στον  $1^\circ \text{ C}$  παρατηρήθηκε αύξηση της ειδικής και ολικής ενεργότητας της PPO στους μάρτυρες κατά 1,3- και 1,8-φορές, αντίστοιχα. Η ειδική ενεργότητα της PPO εμφανίστηκε αυξημένη στους μάρτυρες και στα σπέρματα που είχαν δεχτεί τις επεμβάσεις με AIP, CHX, AIP+CHX, ενώ μειωμένη ενεργότητα βρέθηκε στα σπέρματα που είχαν εμβλαπτιστεί σε COR και όλους τους συνδυασμούς του με τις άλλες ουσίες. Δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στα σπέρματα που είχαν εμβλαπτιστεί σε ACT, AIP+ACT και ACT+CHX. Την εικοστή ημέρα, η υψηλότερη ειδική ενεργότητα της PPO εμφανίστηκε στους μάρτυρες και τον χειρισμό με AIP, η χαμηλότερη στους χειρισμούς με COR και όλους τους συνδυασμούς του με τις άλλες ουσίες, ενώ οι λοιπές επεμβάσεις είχαν ενδιάμεσες τιμές (Γράφημα 3.19, Πίνακας 3.12). Σε σχέση με την 0 d, αυξημένη ολική ενεργότητα της PPO παρατηρήθηκε στους μάρτυρες και στις επεμβάσεις με AIP, ACT, AIP+ACT, μειωμένη ολική ενεργότητα βρέθηκε στις επεμβάσεις με ACT+CHX, COR και όλους τους συνδυασμούς του με τις άλλες ουσίες. Την εικοστή ημέρα, οι υψηλότερες τιμές της ολικής ενεργότητας της PPO βρέθηκαν στους μάρτυρες και στην επέμβαση με AIP, οι χαμηλότερες στην επέμβαση με COR+ACT, ενώ οι λοιπές επεμβάσεις είχαν ενδιάμεσες τιμές.



**Γράφημα 3. 19.** Ειδική και ολική ενεργότητα του ενζύμου πολυφαινόλ-οξειδάση (PPO) στα νοπά σπέρματα καρδιάς ποικιλίας Franquette εμβαπτισμένα σε διάφορες παρεμποδιστικές ουσίες και συντηρημένα στον 1° C για 20 d, στο Πείραμα Δ. Μ, μάρτυρας; ACT, actinomycin D; AIP, 2-aminoindane-2-phosphonic acid; COR, cordycepin; CHX, cycloheximide. Πάνω από κάθε στήλη δίνονται οι πιθανότητες και οι συγκρίσεις των μέσων από την μόνο-παραγοντική ANOVA για κάθε εμβάπτιση περιλαμβάνοντας τις ημέρες συντήρησης 0 και 20 d. Οι κάθετες μπάρες αντιστοιχούν στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$  από μόνο-παραγοντική ANOVA για όλες τις επεμβάσεις την 20 d. NS μη σημαντικό, \* σημαντικό  $P < 0,05$ , \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

Πριν τη συντήρηση στο Πείραμα Δ, στα νωπά σπέρματα της Franquette η ειδική και ολική ενεργότητα της POD ήταν  $\sim 282 \text{ Units mg}^{-1} \text{ πρωτεΐνης min}^{-1}$  και  $\sim 1148 \text{ Units g}^{-1} \text{ DW min}^{-1}$ , αντίστοιχα (Γράφημα 3.20). Μετά από 20 d στον  $1^\circ \text{ C}$  παρατηρήθηκε αύξηση της ειδικής και ολικής ενεργότητας της POD στους μάρτυρες κατά 1,6- και 2,2-φορές, αντίστοιχα. Η ειδική ενεργότητα της POD εμφανίστηκε αυξημένη και στα σπέρματα που είχαν δεχτεί τις επεμβάσεις εκτός από αυτά που είχαν εμβαπτιστεί σε COR και όλους τους συνδυασμούς του με τις άλλες ουσίες. Την εικοστή ημέρα η υψηλότερη ειδική ενεργότητα της POD εμφανίστηκε στους μάρτυρες και τον χειρισμό με AIP, η χαμηλότερη στον χειρισμό με COR+CHX, ενώ οι λοιπές επεμβάσεις είχαν ενδιάμεσες τιμές (Γράφημα 3.20, Πίνακας 3.12). Σε σχέση με την 0 d, αυξημένη ολική ενεργότητα της POD παρατηρήθηκε στους μάρτυρες και στις επεμβάσεις με AIP, ACT, AIP+ACT, ενώ σε όλες τις υπόλοιπες επεμβάσεις οι τιμές της ολικής ενεργότητας ήταν παρόμοιες με αυτές την 0 d. Την εικοστή ημέρα, οι υψηλότερες τιμές της ολικής ενεργότητας της POD βρέθηκαν στους μάρτυρες και στην επέμβαση με AIP, ακολουθούμενες από τις επεμβάσεις με ACT, AIP+ACT, ενώ όλες οι υπόλοιπες επεμβάσεις είχαν τις χαμηλότερες τιμές και παρόμοιες μεταξύ τους.





**Γράφημα 3. 20.** Ειδική και ολική ενεργότητα του ενζύμου υπεροξειδάση (POD) στα νοπά σπέρματα καρδιάς ποικιλίας Franquette εμβλαπτισμένα σε διάφορες παρεμποδιστικές ουσίες και συντηρημένα στον 1° C για 20 d, στο Πείραμα Δ. M, μάρτυρας; ACT, actinomycin D; AIP, 2-aminoindane-2-phosphonic acid; COR, cordycepin; CHX, cycloheximide. Πάνω από κάθε στήλη δίνονται οι πιθανότητες και οι συγκρίσεις των μέσων από την μόνο-παραγοντική ANOVA για κάθε εμβάπτιση περιλαμβάνοντας τις ημέρες συντήρησης 0 και 20 d. Οι κάθετες μπάρες αντιστοιχούν στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$  από μόνο-παραγοντική ANOVA για όλες τις επεμβάσεις την 20 d. NS μη σημαντικό, \* σημαντικό  $P < 0,05$ , \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

### 3.3.4. Σχέσεις μεταξύ των χαρακτηριστικών

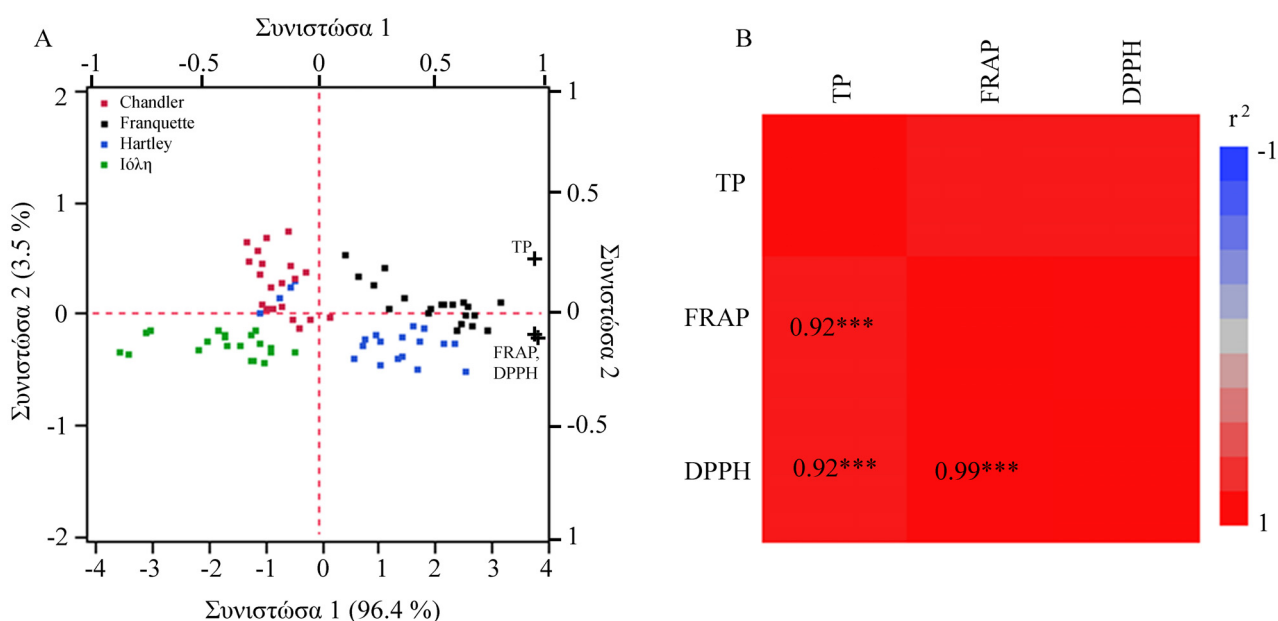
#### 3.3.4.1. Πείραμα Α

Η PCA έδειξε ότι οι δύο πρώτες ερμηνεύσιμες συνιστώσες εξήγησαν συνολικά το 99,9% της συνολικής διακύμανσης των TP, FRAP και DPPH (Πίνακας 3.13), δείχνοντας επίσης στενή θετική σχέση μεταξύ των παραμέτρων αυτών (Γράφημα 3.21A). Οι σημαντικές σχέσεις μεταξύ των τριών αντιοξειδωτικών παραμέτρων,

**Πίνακας 3. 13.** Παράμετροι ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) των αντιοξειδωτικών παραμέτρων (Γράφημα 3.21A) στα νοπά σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρδιάς κατά τη συντήρηση, στο Πείραμα Α.

Συνιστώσα #	Eigenvalue	Εξηγούμενη διακύμανση (%)	Συνολική εξηγούμενη διακύμανση (%)
1	2,893	96,4	96,4
2	0,105	3,5	99,9
3	0,002	0,1	100,0

υποστηρίχθηκαν και από την ανάλυση συσχέτισης έχοντας ανά ζεύγη συντελεστές  $r^2$  άνω του 0,90 (Γράφημα 3.21B). Οι τέσσερις ποικιλίες διαχωρίστηκαν εμφανώς με βάση το score plot με τις ‘Franquette’ και ‘Hartley’ να είναι εγγύτερα στις θέσεις των TP, FRAP και DPPH.



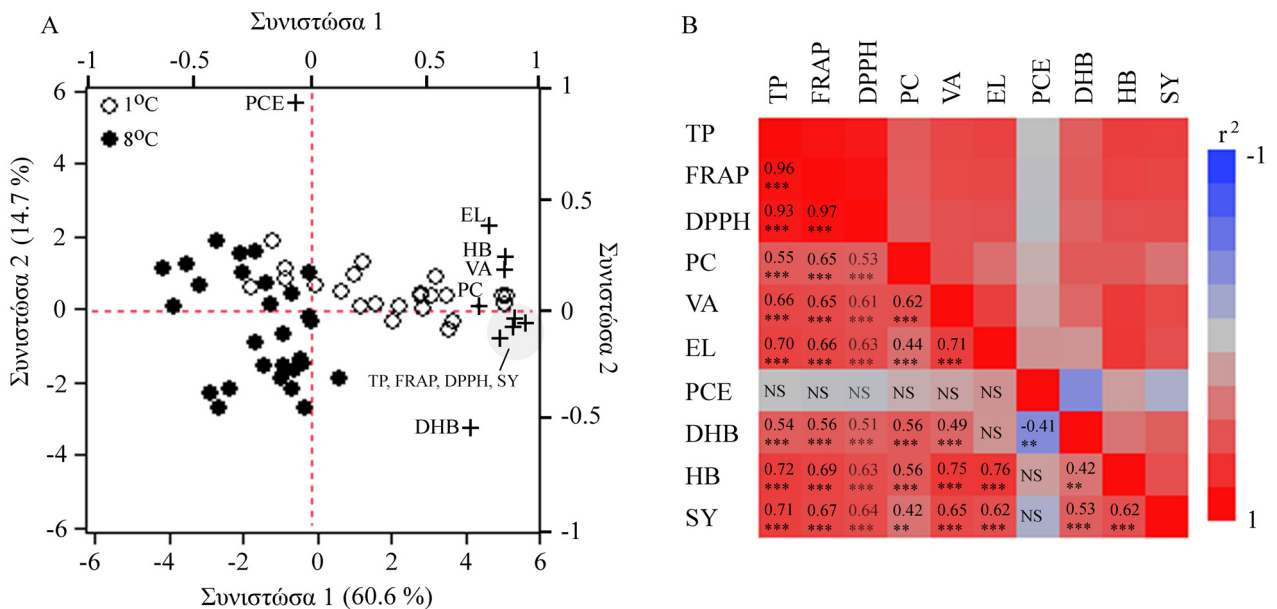
**Γράφημα 3. 21.** (Α) Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) και (Β) ανάλυση συσχέτισης των αντιοξειδωτικών παραμέτρων στα νοπά σπέρματα τεσσάρων ποικιλιών καρδιάς κατά τη συντήρηση, στο Πείραμα Α. Μεταβλητές: ολικά φαινολικά (TP), και αντιοξειδωτική ικανότητα εκτιμώμενη με τις μεθόδους FRAP και DPPH. Στο (Α): αριστερός και κάτω άξονες αντιστοιχούν στις τιμές των κυρίων συνιστωσών (score plot); δεξιάς και επάνω άξονες αντιστοιχούν στους συντελεστές των κυρίων συνιστωσών (loading plot); Τα χρωματιστά τετράγωνα υποδεικνύουν τη θέση του κάθε δείγματος στο score plot; Οι σταυροί υποδεικνύουν τη θέση της κάθε μεταβλητής στο loading plot; Οι τιμές στις παρενθέσεις αντιστοιχούν στο ποσοστό της συνολικής διακύμανσης που εξηγείται από την κάθε συνιστώσα. Στο (Β): χάρτης των συσχετίσεων μεταξύ των μεταβλητών ανά δύο; Για κάθε ζεύγος δίνεται ο συντελεστής συσχέτισης και η πιθανότητα συσχέτισης; \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

### 3.3.4.2. Πείραμα Γ

Η PCA έδειξε ότι οι δύο πρώτες ερμηνεύσιμες συνιστώσες εξήγησαν συνολικά το 75.4% της συνολικής διακύμανσης των TP, FRAP, DPPH και των επτά φαινολικών συστατικών (Πίνακας 3.14). Όλες οι παράμετροι εκτός του PCE βρέθηκαν να έχουν στενές θετικές σχέσεις, με τις στενότερες να παρουσιάζονται μεταξύ TP, FRAP, DPPH και SY (Γράφημα 3.22A). Οι σημαντικές σχέσεις μεταξύ των μεταβλητών υποστηρίχθηκαν και από την ανάλυση συσχέτισης έχοντας ανά ζεύγη συντελεστές  $r^2$  έως και το 0,97 (Γράφημα 3.22A). Η υψηλότερη συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ TP, FRAP και DPPH ( $r^2=0,93-0,97$ ), ενώ από τα φαινολικά συστατικά το SY είχε την ισχυρότερη θετική συσχέτιση με τις τρεις ολικές παραμέτρους (0,64-0,71). Τα σπέρματα που συντηρήθηκαν στον 1° C και τους 8° C διαχωρίστηκαν εμφανώς στο score plot. Μάλιστα, τα δείγματα που συντηρήθηκαν στον 1° C είχαν θέσεις πιο κοντά στις θέσεις όλων των μεταβλητών πλην του PCE.

**Πίνακας 3. 14.** Παράμετροι ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) των αντιοξειδωτικών παραμέτρων και των φαινολικών συστατικών (Γράφημα 3.22A) στα νωπά σπέρματα καρδιάς ποικιλίας Franquette κατά τη συντήρηση, στο Πείραμα Γ.

Συνιστώσα #	Eigenvalue	Εξηγούμενη διακύμανση (%)	Συνολική εξηγούμενη διακύμανση (%)
1	6,063	60,6	60,6
2	1,473	14,7	75,4
3	0,782	7,8	83,2
4	0,605	6,0	89,2
5	0,305	3,1	92,3
6	0,267	2,7	94,9
7	0,233	2,3	97,3
8	0,191	1,9	99,2
9	0,060	0,6	99,8
10	0,022	0,2	100,0



**Γράφημα 3. 22.** (Α) Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) και (Β) ανάλυση συσχέτισης των ολικών αντιοξειδωτικών παραμέτρων και επτά φαινολικών συστατικών στα νωπά σπέρματα καρυδιάς ποικιλίας Franquette κατά τη συντήρηση, στο Πείραμα Γ. Μεταβλητές: ολικά φαινολικά (TP), αντιοξειδωτική ικανότητα εκτιμώμενη με τις μεθόδους FRAP και DPPH, 4-υδοξυβενζοϊκό οξύ (HB), 2,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ (DHB), πρωτοκατεχικό οξύ (PC), αιθυλεστερας πρωτοκατεχικού (PCE), βανιλικό οξύ (VA), συρινγικό οξύ (SY), ελλαγικό οξύ (EL). Στο (Α): αριστερός και κάτω άξονες αντιστοιχούν στις τιμές των κυρίων συνιστωσών (score plot); δεξιά και επάνω άξονες αντιστοιχούν στους συντελεστές των κυρίων συνιστωσών (loading plot); Οι κύκλοι υποδεικνύουν τη θέση του κάθε δείγματος στο score plot; Οι σταυροί υποδεικνύουν τη θέση της κάθε μεταβλητής στο loading plot; Οι τιμές στις παρενθέσεις αντιστοιχούν στο ποσοστό της συνολικής διακύμανσης που εξηγείται από την κάθε συνιστώσα. Στο (Β): χάρτης των συσχετίσεων μεταξύ των μεταβλητών ανά δύο; Για κάθε ζεύγος δίνεται ο συντελεστής συσχέτισης και η πιθανότητα συσχέτισης; NS μη σημαντικό, \*\* Σημαντικό  $P < 0,01$  \*\*\* Σημαντικό  $P < 0,001$ .

### 3.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

#### 3.4.1. Χαρακτηριστικά ολόκληρων ενδοκαρπίων καρδιάς (OE) κατά τη συντήρηση

Πριν τη συντήρηση, τα παρατηρούμενα επίπεδα παραγωγής CO<sub>2</sub> για όλες τις ποικιλίες, τόσο των OE όσο και των σπερμάτων, ήταν χαμηλά έως μέτρια συγκρινόμενα με άλλα φρούτα (Burton, 1982). Τα επίπεδα αναπνοής των OE ήταν κατά 17% χαμηλότερα κατά μέσο όρο από τα αντίστοιχα των σπερμάτων, παρόλο που το σπέρμα αποτελεί περίπου το 43-58 % του βάρους του OE. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι τα μετρούμενα επίπεδα παραγωγής CO<sub>2</sub> από το OE μπορεί να προέρχονται αθροιστικά τόσο από τη διάχυση παραγόμενου CO<sub>2</sub> από το σπέρμα μέσω του κελύφους, όσο και από την παραγωγή CO<sub>2</sub> από μέρη του κελύφους. Η ύπαρξη παραγωγής CO<sub>2</sub>, και επομένως αναπνευστική δραστηριότητα από το κέλυφος, επιβεβαιώθηκε με μετρήσεις στα θραύσματα του κελύφους μετά την αφαίρεση του σπέρματος. Η μέτρηση αυτή πραγματοποιήθηκε για να επιβεβαιωθεί η αναπνευστική δραστηριότητα μερών του κελύφους, ωστόσο δεν έγινε ποσοτικοποίηση του παραγόμενου CO<sub>2</sub>, δεδομένου ότι η θραυσματοποίηση (τραυματισμός) μπορεί να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση των επιπέδων αναπνοής (Abeles et al., 1992).

Τα δεδομένα για την αναπνοή των νωπών καρπών Ακροδρύων είναι περιορισμένα. Οι Moscetti et al. (2012), βρήκαν σε μη ώριμα ενδοκάρπια φουντουκιών επίπεδα αναπνοής περίπου 0,5 mmol CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, τα οποία είχαν πτωτική τάση κατά τη 12-ήμερη συντήρηση στους 10° C, αλλά παρέμειναν αμετάβλητα στους 4° C. Κατά την έκθεση των φιστικιών στους 20° C για 10 d παρατηρήθηκε οξεία πτώση της αναπνοής (Labavitch et al., 1982), γεγονός που παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη κατά τη συντήρηση των καρυδιών. Ωστόσο, η πτώση της αναπνοής των αποκελυφομένων σπερμάτων ήταν πολύ πιο απότομη σε σχέση με την πτώση των OE, γεγονός που υποδεικνύει τον πιθανό προστατευτικό ρόλο του κελύφους στη διατήρηση της μεταβολικής δραστηριότητας στο σπέρμα της καρυδιάς.

Η σκληρότητα του κελύφους του καρυδιού θεωρείται ποιοτικό χαρακτηριστικό, καθώς καρποί με μικρή σκληρότητα θα πρέπει να προτιμώνται, ώστε κατά την εξαγωγή του σπέρματος να μειώνονται οι τραυματισμοί (Koyuncu et al., 2004a). Στην παρούσα μελέτη, οι τιμές της σκληρότητας του κελύφους για τις τέσσερις ποικιλίες ήταν εντός του εύρους (170-290 N) που έχει αναφερθεί και για άλλες ποικιλίες καρυδιών, οι οποίες όμως είχαν μετρηθεί με διαφορετικό όργανο (Koyuncu et al., 2004b). Η σκληρότητα του κελύφους των ξηρών καρπών εξαρτάται από τη δομή του κελύφους, τις διαστάσεις και το σχήμα του καρπού (Braga et al., 1999; Koyuncu et al., 2004a). Η μεγαλύτερη σκληρότητα της 'Hartley' μπορεί να αποδοθεί στο μεγαλύτερο ποσοστό κελύφους (~57 %), το μικρότερο μέγεθος (μήκος, πλάτος και βάρος) αλλά και στο πυραμιδοειδές σχήμα του καρπού της (Hendries et al., 1998).

Η σκληρότητα σε όλες τις ποικιλίες δεν επηρεάστηκε κατά τη συντήρηση γεγονός που δεν την καθιστά κρίσιμο χαρακτηριστικό κατά τη συντήρηση των νωπών καρυδιών.

Πριν τη συντήρηση, οι τιμές των παραμέτρων του χρώματος έδειξαν έναν ανοικτό λευκο-κίτρινο χρωματισμό των σπερμάτων όλων των ποικιλιών. Ωστόσο τα σπέρματα της Chandler και της Ιόλης, μπορούν να θεωρηθούν καλύτερης χρωματικής εμφάνισης καθώς είχαν πιο έντονο λευκό χρώμα (υψηλότερα  $L^*$  και  $h^o$ ). Οι τιμές των  $L^*$  και  $h^o$  των νωπών σπερμάτων ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες που καταγράφηκαν στα αποξηραμένα σπέρματα (Κεφάλαιο 2) υποδεικνύοντας την υπεροχή των πρώτων όσον αφορά την εμφάνιση. Κατά τη συντήρηση, το  $L^*$  και το  $h^o$  είχαν τάση μείωσης που υποδηλώνει το καφέτιασμα των σπερμάτων και την ποιοτική υποβάθμιση. Ωστόσο, η συντήρηση με κέλυφος των σπερμάτων περιόρισε ελαφρά το καφέτιασμα, προφανώς λόγω της προστατευτικής επίδρασης του κελύφους. Όσον αφορά το χρώμα, η Chandler είχε την καλύτερη σταθερότητα κατά τη συντήρηση και μάλιστα μέχρι τις 20 d τα σπέρματά της δεν καφέτιασαν. Αντίθετα η Ιόλη είχε μικρή σταθερότητα έχοντας τις μεγαλύτερες μειώσεις των  $L^*$  και το  $h^o$ . Όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 2, το καφέτιασμα αποδίδεται στην ενζυμική ή/και στην χημική οξείδωση των φαινολικών που οδηγεί στο σχηματισμό ουσιών με σκούρο χρωματισμό (Manzocco et al., 2000). Μάλιστα, το ποσοστό μείωσης των  $L^*$  και  $h^o$  κατά την 40-d συντήρηση των νωπών σπερμάτων στον  $1^{\circ}\text{C}$  ήταν περίπου αντίστοιχη με αυτή των αποξηραμένων μετά από 12 mo. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την μεγάλη φθαρτότητα των νωπών καρυδιών σε σχέση με τα αποξηραμένα. Ένας από τους λόγους που γίνεται η αποξηήρανση των προϊόντων είναι και για μειωθεί η ένταση της ενζυμικής οξείδωσης (Manzocco et al., 2000). Η ταχύτερη εμφάνιση του καφετιάσματος στα νωπά σπέρματα πιθανόν να οφείλεται στην εντονότερη ενζυμική οξείδωση των φαινολικών τους, λόγω αυξημένης ενεργότητας των οξειδωτικών ενζύμων (PPO, POD) σε σχέση με τα αποξηραμένα. Μάλιστα, όπως παρατηρήθηκε (Πείραμα Δ), οι ενεργότητες των PPO, POD στα σπέρματα της 'Franquette' αυξήθηκαν κατά τη συντήρηση στον  $1^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.4.2. Θρεπτική αξία κατά τη συντήρηση**

Τόσο στο Πείραμα Α όσο και στο Πείραμα Β, τα νωπά σπέρματα της 'Franquette' είχαν τα υψηλότερα επίπεδα TP ενώ αυτά της 'Ιόλη' τα χαμηλότερα. Σε όλα τα πειραματικά έτη, οι τιμές TP των νωπών σπερμάτων ήταν στα ανώτατα όρια των τιμών που αναφέρονται στη βιβλιογραφία ( $10\text{-}23\text{ mg GAE g}^{-1}$ ) για τα αποξηραμένα (Anderson et al., 2001; Arranz et al., 2008; Kornsteiner et al., 2006; Labuckas et al., 2008; Yang et al., 2009), αλλά και τα νωπά (Arcan and Yemenicioglu, 2009). Τα επίπεδα των TP ενισχύουν την υψηλή θρεπτική αξία των καρυδιών, η οποία ακόμα και για την 'Ιόλη' που είχε τις μικρότερες συγκεντρώσεις, είναι από τις υψηλότερες μεταξύ διαφόρων φυτικών προϊόντων (Kornsteiner et al., 2006;

Podsdek, 2007; Wu et al., 2004; Yang et al., 2009). Μικρές διαφορές στις τιμές των TP μεταξύ των διαφόρων μελετών που αφορούν τα καρύδια μπορούν να αποδοθούν στις διαφορετικές πηγές του φυτικού υλικού αλλά και στην επεξεργασία (αποξήρανση) που είχαν υποβληθεί οι καρποί.

Στο Πείραμα Α, όλες οι ποικιλίες είχαν υψηλή TAC, εκτιμούμενη με τις μεθόδους FRAP και DPPH. Δεδομένου ότι η εκτίμηση της TAC μπορεί να γίνει με διάφορες μεθόδους, όπου η κάθε μια μπορεί να εκτιμά διαφορετικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, καθώς επίσης η έκφρασή της να γίνεται με διάφορους τρόπους (Arak et al., 2007; Huang et al., 2005; Prior et al., 2005), είναι δύσκολο να συγκριθούν αποτελέσματα μεταξύ διαφόρων μελετών. Οι τιμές της TAC για τις τέσσερις ποικιλίες που βρέθηκαν στην παρούσα μελέτη, εκφραζόμενες σε  $\mu\text{mol TAE g}^{-1} \text{ DW}$ , είναι σε γενική συμφωνία με αυτές που έχουν βρεθεί στα αποξηραμένα καρύδια με τις μεθόδους FRAP (Halvorsen et al., 2002; Halvorsen et al., 2006) και ABTS assay (Arranz et al., 2008). Μάλιστα, οι τιμές TAC ήταν μεταξύ των υψηλότερων συγκρινόμενες με τις τιμές άλλων φυτικών προϊόντων (Halvorsen et al., 2002; Halvorsen et al., 2006), ακόμα υψηλότερες από καρπούς που θεωρούνται εξαιρετική πηγή αντιοξειδωτικών (ρόδια, φραγκοστάφυλα και μύρτιλα).

Τάση αύξησης της συγκέντρωσης των TP παρατηρήθηκε στα σπέρματα που συντηρήθηκαν στον  $1^{\circ} \text{C}$  τόσο στο Πείραμα Α όσο στο Πείραμα Γ, δείχνοντας ότι η έκθεση των καρυδιών σε χαμηλές θερμοκρασίες οδηγεί σε βελτίωση της θρεπτικής τους αξίας. Στα σπέρματα των καρυδιών έχει βρεθεί σημαντική συνεισφορά των φαινολικών στην TAC (Li et al., 2006). Πράγματι, στην παρούσα μελέτη η TAC είχε παρόμοια πορεία αύξησης με τα TP κατά τη συντήρηση των νωπών σπερμάτων, οδηγώντας στην βελτίωση της θρεπτικής αξίας και από την άποψη του αντιοξειδωτικού χαρακτήρα των σπερμάτων. Η στενή σχέση μεταξύ TP και TAC επιβεβαιώθηκε και από τις αναλύσεις PCA και συσχέτισης, υποδεικνύοντας την ισχυρή συνεισφορά των φαινολικών στην θρεπτική αξία των καρυδιών. Τόσο για τα TP όσο και την TAC, ο τρόπος συντήρησης (με- ή χωρίς-κέλυφος) των σπερμάτων δεν επηρέασε τις τιμές τους. Έτσι το κέλυφος, παρόλο που περιορίζει ελαφρά το καφέτιασμα, δεν αποτελεί χαρακτηριστικό που μπορεί να επηρεάσει τα αντιοξειδωτικά κατά τη συντήρηση των νωπών καρυδιών.

Κατά τη μελέτη των μεμονωμένων φαινολικών συστατικών στα νωπά σπέρματα της 'Franquette' σε δύο Πειράματα (Γ και Δ), ταυτοποιήθηκαν και μετρήθηκαν τα φαινολικά οξέα HB, DHB, PC, PCE, VA, SY και EL. Παρόλο που τα καρύδια θεωρούνται εξαιρετική πηγή φαινολικών, μόνο ελάχιστα μεμονωμένα φαινολικά έχουν ταυτοποιηθεί, ενώ δεν υπάρχουν αναφορές για τα νωπά σπέρματα. Σε αποξηραμένα σπέρματα έχουν βρεθεί τα EL (Colaric et al., 2005; Li et al., 2006), SY (Colaric et al., 2005), HB, VA και PC (Zhang et al., 2009). Συγκεκριμένα, οι Colaric et al. (2005) βρήκαν στα σπέρματα της 'Franquette' SY και EL σε

συγκεντρώσεις 487 and 89  $\mu\text{g g}^{-1}$ , αντίστοιχα, ενώ οι Li et al. (2006) αναφέρουν ότι το EL ως το πιο άφθονο φαινολικό σε συγκέντρωση 320  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Οι διαφορές στις περιεκτικότητες των μεμονωμένων φαινολικών μεταξύ της παρούσας μελέτης και των άλλων εργασιών μπορεί να οφείλονται εκτός από διαφορές σε αγρονομικούς παράγοντες και στη διαφορετική κατάσταση των σπερμάτων που εξετάστηκαν (νωπά, αποξηραμένα) και στη μέθοδο εκχύλισης και μέτρησης. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην παρούσα μελέτη, τα DHB και PCE προσδιορίστηκαν για πρώτη φορά στην καρυδιά και η ύπαρξή τους στο σπέρμα επιβεβαιώθηκε και με τη χρήση φασματογράφου μαζών (MS).

Για τα έξι από τα επτά φαινολικά (HB, DHB, PC, VA, SY και EL) παρατηρήθηκε αύξηση των συγκεντρώσεων τους κατά τη συντήρηση των σπερμάτων στον 1<sup>ο</sup> C τόσο την Πείραμα Γ όσο και στο Πείραμα Δ. Από την PCA και τις αναλύσεις συσχέτισης βρέθηκε στενή σχέση των μεμονωμένων φαινολικών που αυξήθηκαν με τα TP και την TAC. Οι αυξήσεις αυτές αντανακλούν σε βελτίωση της θρεπτικής αξίας του προϊόντος. Μάλιστα για το EL αναφέρεται ότι έχει εξαιρετική αξία για την ανθρώπινη υγεία (Anderson et al., 2001; Papoutsis et al., 2008), γεγονός που κάνει την αύξησή του εξαιρετικά σημαντική. Σύμφωνα με τους Cisneros-Zevallos (2003) η ελεγχόμενη πρόκληση αβιοτικής καταπόνησης σε φρέσκα φρούτα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ενισχυθεί η περιεκτικότητα σε διατροφολογικές ουσίες και η προστιθέμενη αξία του προϊόντος.

### **3.4.3. Σύγκριση νωπών και αποξηραμένων σπερμάτων καρυδιών**

Κατά τη συγκομιδή στο Πείραμα Β, τα νωπά σπέρματα είχαν περιεκτικότητα σε υγρασία περίπου 35%, επίπεδα που είναι σε γενική συμφωνία με τις τιμές που αναφέρονται για τα καρύδια στο στάδιο της συγκομιδής (Ποντίκης, 2002) και στα επίπεδα που έχουν βρεθεί σε ποικιλίες διαφορετικές από αυτές που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη (Hassan-Beygi et al., 2009). Η αποξήρανση (στους 36<sup>ο</sup> C για 24 h) οδήγησε σε μείωση της υγρασίας, σε όλες τις δειγματοληψίες, σε επίπεδα περίπου του 8% (w/w), τα οποία ήταν εντός των ορίων (3-13%) που προτείνονται για τους αποξηραμένους καρπούς της καρυδιάς (Kader and Thompson, 2002).

Η αποξήρανση προκάλεσε σημαντικά μειωμένη συγκέντρωση TP των ξηρών σπερμάτων σε σχέση με τα νωπά, γεγονός που ήταν αναμενόμενο, δεδομένου ότι κατά την επεξεργασία ενός φυτικού προϊόντος παρατηρούνται απώλειες αντιοξειδωτικών ουσιών (Amarowicz et al., 2009; Manzocco et al., 2000; Nicoli et al., 1999). Οι απώλειες των φαινολικών ουσιών κατά την αποξήρανση εξαρτώνται από τις συνθήκες κάτω από τις οποίες η επεξεργασία πραγματοποιείται. Στα φιστίκια παρατηρήθηκε απώλεια TP κατά 47% όταν αποξηράνθηκαν στον ήλιο για 3 d (Ballisteri et al., 2009), ενώ οι απώλειες ήταν περίπου 14% κατά την αποξήρανση στους 45<sup>ο</sup> C για 34 h (Tsantili et al., 2011). Στην παρούσα μελέτη,



παρόλο που χρησιμοποιήθηκαν ήπιες συνθήκες αποξήρανσης, δεν αποφεύχθηκαν οι απώλειες των TP, γεγονός που επιβεβαιώνει την υπεροχή της θρεπτικής αξίας των νωπών καρυδιών έναντι των αποξηραμένων, τουλάχιστον ως προς τις φαινολικές ουσίες. Ωστόσο, τα αποξηραμένα σπέρματα που προήλθαν μετά από έκθεση για 10 ή/και 20 d νωπών ΟΕ στον 1° C είχαν αυξημένα επίπεδα TP σε σχέση με τα σπέρματα που προήλθαν από αποξήρανση αμέσως μετά τη συγκομιδή. Με βάση αυτά τα δεδομένα μπορεί να προταθεί η πρακτική αυτή (έκθεση νωπών καρυδιών στον 1° C) ως ένα τρόπος αύξησης της θρεπτικής αξίας των αποξηραμένων σπερμάτων καρυδιάς.

#### **3.4.4. Μεταβολές φαινολικών σε σχέση με τη θερμοκρασία συντήρησης**

Οι φαινολικές ουσίες στα φυτά γενικά εμπλέκονται στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι βιοτικών ή/και αβιοτικών καταπονήσεων (Dixon and Paiva, 1995). Στην παρούσα μελέτη, η αύξηση των TP επιπέδων και των έξι από τα επτά μεμονωμένα φαινολικά παρατηρήθηκαν στα σπέρματα που είχαν εκτεθεί στον 1° C. Το γεγονός αυτό πιθανόν ήταν αποτέλεσμα της αντίδρασης των καρυδιών στη καταπόνηση από την χαμηλή θερμοκρασία, δεδομένου ότι παρόμοιες αυξήσεις δεν παρατηρήθηκαν με την έκθεση των σπερμάτων στους 8° C (Πείραμα Γ). Αυξήσεις των φαινολικών σε διάφορους φυτικούς ιστούς έχουν παρατηρηθεί σε ένα εύρος χαμηλών θερμοκρασιών. Για παράδειγμα, αυξημένα επίπεδα TP έχουν βρεθεί σε μπανάνες συντηρημένες στους 8° C (Chen et al., 2008), σε φύλλα ελιάς σε θερμοκρασίες κοντά στους 0° C (Ortega-García and Peragón, 2009) και σε ελαιοκράμβη εκτεθειμένη σε θερμοκρασίες έως και -5° C (Solecka and Kacperska, 2003).

Η αύξηση των συγκεντρώσεων των φαινολικών από την χαμηλή θερμοκρασία προέρχεται από την επαγωγή του μεταβολισμού των φανυλ-προπανοειδών (PhP) κατά τον οποίο η PAL είναι το κύριο ένζυμο το οποίο καταλύει τη μη-οξειδωτική *L*-απαμίνωση της φαινυλαλανίνης, σχηματίζοντας *trans*-κινναμικό οξύ (Tomás-Barberán and Espín, 2001; Wen et al., 2005). Πράγματι, στην παρούσα εργασία βρέθηκε αυξημένη ενεργότητα της PAL (ειδική και ολική) στα σπέρματα του μάρτυρα μετά από 20 d έκθεση στον 1° C (Πείραμα Δ). Παράλληλα, την εικοστή ημέρα στα σπέρματα που είχαν δεχτεί επέμβαση με την AIP (παρεμποδιστή δράσης της PAL) παρατηρήθηκε μειωμένη ενεργότητα (ειδική και ολική) της PAL, η οποία ήταν χαμηλότερη ακόμα και από την αρχική (0 d) του μάρτυρα. Το γεγονός ότι στους μάρτυρες την 20 d η αύξηση της ολικής ενεργότητας της PAL (κατά 3,4-φορές) ήταν μεγαλύτερη από την αύξηση της ειδικής της ενεργότητας (κατά 2,3-φορές) σημαίνει ότι πιθανόν η έκθεση των σπερμάτων στον 1° C προκάλεσε όχι μόνο την ενεργοποίηση, αλλά και τη σύνθεση νέων μονάδων του ενζύμου (*de novo* σύνθεση). Πράγματι, σε μπανάνες εκτεθειμένες σε χαμηλή θερμοκρασία έχει παρατηρηθεί συσσώρευση μονάδων της PAL, και παράλληλη συσσώρευση των μεταγραφών της MaPAL1 και MaPAL2 (Chen et al., 2008).

Στην παρούσα εργασία, μειωμένες ενεργότητες PAL βρέθηκαν με τις επεμβάσεις με ACT (παρεμποδιστή μεταγραφής mRNA), COR (παρεμποδιστή σύνθεσης RNA) και CHX (παρεμποδιστή σύνθεσης πρωτεϊνών) οι οποίοι μπορεί να έδρασαν είτε άμεσα επί της ενεργοποίησης, γονιδιακής έκφρασης ή/και σύνθεσης της PAL, ή έμμεσα επί άλλων παραγόντων (ενζύμων και ουσιών) που εμπλέκονται στον παραπάνω μεταβολισμό. Σύμφωνα με τους Leyva et al. (1995), στα φύλλα του *Arabidopsis thaliana* εκτεθειμένα σε χαμηλές θερμοκρασίες παρατηρήθηκε συσσωρευση mRNA τόσο της PAL όσο και του ενζύμου χαλκόν-συνθετάση (CHS) που δραστηριοποιείται και αυτό στο PhP.

Η αύξηση των TP στα σπέρματα που συντηρήθηκαν στον 1° C παρεμποδίστηκε από τους χειρισμούς με AIP τόσο στο Πείραμα Γ όσο και στο Πείραμα Δ. Επομένως η PAL ήταν υπεύθυνη (τουλάχιστον μερικώς) για την παρατηρούμενη αύξηση των TP. Στους χειρισμούς της AIP σε συνδυασμό με τις άλλες τρεις ουσίες (ACT, COR, CHX) δεν παρεμποδίστηκε μόνο η αύξηση των TP, αλλά επιπλέον τα επίπεδα των TP ήταν χαμηλότερα από αυτά των σπερμάτων πριν τη συντήρηση (Πείραμα Δ). Το γεγονός αυτό πιθανόν να σημαίνει ότι κατά τη συντήρηση συνέβαινε παράλληλα με τη σύνθεση και αποδόμηση φαινολικών. Ένδειξη απώλειας φαινολικών κατά τη συντήρηση προκύπτει και μέσω του καφετιάσματος που παρατηρήθηκε (Πείραμα Α), και αποδίδεται στην οξειδωτική αποδόμηση των φαινολικών (χημική ή ενζυματική) των φυτικών προϊόντων κατά τη συντήρηση (Manzocco et al., 2001; Tomás-Barberán and Espín, 2001).

Στην οξειδωτική αποδόμηση των φαινολικών συστατικών, τα ένζυμα PPO και POD επηρεάζουν κυρίως την ποιότητα του προϊόντος, καθώς οδηγούν στην παραγωγή καφέ πολυμερών (μελανίνες) (Manzocco et al., 2000; Tomás-Barberán and Espín, 2001). Η PPO είναι ένα χαλκούχο ένζυμο το οποίο μπορεί να είναι είτε λανθάνον ή ενεργό σε πολλούς φυτικούς ιστούς (Espín et al., 1999a; Whitaker, 1995). Η PPO θεωρείται υπεύθυνη για την κατάλυση δυο διαφορετικών αντιδράσεων με την παρουσία μοριακού O<sub>2</sub>. Καταλύει την υδροξυλίωση των μόνο-φαινολών σε *ο*-δι-φαινόλες, όπως επίσης και την οξείδωση των *ο*-δι-φαινολών σε *ο*-κινόνες (Sanchez-Ferrer et al., 1995). Οι *ο*-κινόνες πολυμερίζονται μη-ενζυμικά και δίνουν ετερογενείς μελανές, καφέ ή ερυθρές χρωστικές που καλούνται με το κοινό όνομα 'μελανίνες' (Solomon et al., 1996; Zawistowski et al., 1991). Η POD δρα επί μεγάλου αριθμού ενώσεων διενεργώντας οξείδωση με μεταφορά μονήρους ηλεκτρονίου υπό την παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (Tomás-Barberán and Espín, 2001). Παρόλο που οι υπεροξειδάσες είναι ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο, ο ρόλος τους στο καφέτιασμα των καρπών είναι αμφισβητήσιμος λόγω των χαμηλών ή μηδενικών ενδογενών επιπέδων υπεροξειδίου του υδρογόνου στα φυτά που περιορίζει την δράση των υπεροξειδασών. Ωστόσο, η εμπλοκή τους στο ενδογενές καφέτιασμα δεν μπορεί να αποκλειστεί. Προτείνεται ότι η PPO μπορεί να δρα προωθητικά επί της δραστηριότητας της

POD, γεγονός που αποδίδεται στη δημιουργία υπεροξειδίου του υδρογόνου κατά την οξείδωση των φαινολικών στις PPO-καταλυόμενες αντιδράσεις (Richard-Forget and Gaillard, 1997; Subramanian et al., 1999). Το επίπεδο των αντιοξειδωτικών ουσιών στους καρπούς μπορεί επίσης να μειωθεί μέσω της άμεσης οξείδωσης τους από την PPO και την POD (Espin and Wichers, 2000; Jiménez and García-Carmona, 1999). Έτσι ο κύριος παράγοντας καφετιάσματος του καρπού είναι η PPO, ενώ η συνεργηστική δράση της PPO με την POD δεν μπορεί να αποκλειστεί. Επομένως, στην παρούσα εργασία, τα επίπεδα TP και μεμονωμένων φαινολικών που προσδιορίστηκαν σε κάθε δειγματοληψία κατά τη συντήρηση ήταν το τελικό αποτέλεσμα των δύο φαινομένων (βιοσύνθεση και οξείδωση). Πράγματι, όπως βρέθηκε τόσο στο Πείραμα Γ όσο και στο Πείραμα Δ τα επίπεδα του PCE μειώθηκαν ακόμα και στον 1° C, ενώ από την Πείραμα Δ βρέθηκε ότι σε κάποιες επεμβάσεις μετά από 20 d οι συγκεντρώσεις των HB, VA, SY ήταν μειωμένες.

Στην παρούσα μελέτη, πριν τη συντήρηση οι PPO και POD βρέθηκαν ενεργές στα σπέρματα των καρυδιών (Πείραμα Δ). Οι τραυματισμοί των ιστών (μώλωπες, πληγές, λύση κυττάρων) οδηγούν σε μια αλληλουχία μεταβολικών φαινομένων τα οποία περιλαμβάνουν την δραστηριοποίηση της λανθάνουσας PPO (Espin et al., 1999a ; Espin and Wichers, 1999b) ή/και την *de novo* επαγωγή της, όπως επίσης και την επαγωγή της POD (Hyodo et al., 1991; Ketsa and Atantee, 1998; Roberts et al., 1988). Έτσι, ένα ποσοστό των αρχικών ενεργοτήτων τους πιθανόν να οφειλόταν στον τραυματισμό των σπερμάτων κατά την αφαίρεση του κελύφους και στην διαίρεση τους σε ημισπέρμια για την διεξαγωγή του πειράματος. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η επίδραση του τραυματισμού θα πρέπει να ήταν εξαιρετικά μικρή δεδομένου ότι για την εκχύλιση των δειγμάτων γινόταν λήψη μόνο του ακραίου τμήματος του ημισπερμίου, και απορριπτόταν το βασικό στο οποίο είχε γίνει η διαίρεση.

Τόσο για την PPO όσο και την POD, μετά από 20 d στον 1° C παρατηρήθηκε αύξηση των ειδικών και ολικών ενεργοτήτων τους. Όσον αφορά την PPO έχει παρατηρηθεί αύξηση της ειδικής ενεργότητάς της σε καρπούς πολλών ειδών (ανανάς, ροδακινιά, δαμασκηλιά, μαρούλι, μάνγκο) κατά την έκθεσή τους σε χαμηλές θερμοκρασίες (Boo et al., 2011; Jin et al., 2009; Lin et al., 2011; Luo et al., 2011; Zhou et al., 2003). Αντιθέτα, τα αποτελέσματα που αφορούν την επίδραση των χαμηλών θερμοκρασιών συντήρησης επί της ειδικής ενεργότητας της POD είναι αντικρουόμενα. Συγκεκριμένα, με την επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών, βρέθηκε αυξημένη ειδική ενεργότητα της POD σε μάνγκο και δαμάσκηνα (Lin et al., 2011; Luo et al., 2011), μειωμένη σε μαρούλια και ροδάκινα (Boo et al., 2011; Jin et al., 2009), ενώ δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές της ενεργότητας σε ανανά (Zhou et al., 2003). Σε μήλα κατά τη συντήρηση στον 0,5° C παρατηρήθηκαν ακανόνιστες μεταβολές της ειδικής ενεργότητας της POD οι τιμές της οποίας ήταν εξαρτώμενες από την ποικιλία (Tsantili et al., 2007).

Στην παρούσα μελέτη, στους μάρτυρες μετά από 20 d στον 1° C, η αύξηση των ολικών ενεργοτήτων (κατά 1,8- και 2,2-φορές της PPO και POD, αντίστοιχα) ήταν μεγαλύτερη από την αύξηση των ειδικών τους ενεργοτήτων (κατά 1,3- και 1,6-φορές της PPO και POD, αντίστοιχα) γεγονός που σημαίνει την πιθανή, όπως σημειώθηκε και στην περίπτωση της PAL, τη *de novo* σύνθεση νέων μονάδων ενζύμων. Η αυξημένη ενεργότητα της PPO υπό χαμηλές θερμοκρασίες, δεν συνδέεται πάντα με αύξηση της έκφρασης των γονιδίων της (Raimbault et al., 2011), καθώς στην μπανάνα και το σπανάκι η αυξημένη ενεργότητα της PPO αποδόθηκε κυρίως στην ενέργηση του λανθάνοντος ενζύμου (Gooding et al., 2001; Lieberei et al., 1981). Αντίθετα όπως βρέθηκε στον ανανά σύμφωνα με τους Raimbault et al. (2011) οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην PPO και POD υπό την επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών είναι αποτέλεσμα *de novo* σύνθεσης της PPO, αλλά όχι της POD. Όσον αφορά την POD η έκφραση και σύνθεσή της επάγεται από ένα πλήθος αβιοτικών καταπονήσεων (αλατότητα, ορμόνες, τραυματισμός, υπεροξείδιο του υδρογόνου) (Gao et al., 2010; Kim et al., 2000; Park et al., 2003) συμπεριλαμβανομένων και των χαμηλών θερμοκρασιών (Huh et al., 1997).

Οι μεταβολές των ειδικών και ολικών ενεργοτήτων σε σχέση με τις αρχικές τους τιμές τόσο για την PPO όσο και την POD ήταν παρόμοιες στα σπέρματα που είχαν δεχτεί τις επεμβάσεις με ACT, COR, CHX και τους συνδυασμούς τους. Επομένως, οι παραπάνω επεμβάσεις παρεμπόδισαν τη σύνθεση νέων μονάδων PPO και POD, επεμβαίνοντας στα στάδια της μεταγραφής (transcription) ή/και της μετάφρασης (translation) ή/και της σύνθεσης (translation). Τα αποτελέσματα δείχνουν μάλλον ότι στα σπέρματα της καρυδιάς παρατηρείται τόσο ενεργοποίηση όσο και *de novo* σύνθεση (μάρτυρες) των δυο αυτών ενζύμων με την επίδραση θερμοκρασίας 1° C.

Με βάση όλα τα παραπάνω και σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από το Πείραμα Δ, θα μπορούσε να ερμηνευθεί και ο μεταβολισμός των μεμονομένων φαινολικών στα σπέρματα των καρυδιών. Τα φαινολικά που προσδιορίστηκαν (HB, DHB, PC, PCE, VA, SY, EL) ανήκουν στην ομάδα των υδροξυβενζοϊκών οξέων (Seigler, 1998; Strack, 1997; Vermerris and Nicholson, 2008). Μια κύρια πιθανή οδός βιοσύνθεσης της ομάδας αυτής των φαινολικών είναι μέσω του PhP με αποδόμηση της πλευρικής ανθρακικής αλυσίδας των υδροξυκινναμικών και απομάκρυνση ενός οξικού (Chakraborty et al., 2009; Sircar and Mitra, 2009). Στο Πείραμα Δ στους μάρτυρες την 20 d, οι αυξήσεις των HB, DHB, PC, VA, SY και EL συνδυάστηκαν και με αυξημένη ενεργότητα (ειδική και ολική) της PAL, γεγονός που μπορεί να σημαίνει τη βιοσύνθεση αυτών των φαινολικών μέσω του PhP.

Ωστόσο, όταν εφαρμόστηκε η AIP (μειωμένες ενεργότητες της PAL) παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των παραπάνω φαινολικών ως προς τις μεταβολές τους. Τα PC και EL εξακολούθησαν να έχουν αυξητικές τάσεις ακόμα και μετά τον χειρισμό με AIP. Τα επίπεδα

του PC στους μάρτυρες και την AIP ήταν παρόμοια, γεγονός που μπορεί να σημαίνει ότι το PC είτε βιοσυντίθεται εκτός του PhP ή/και βιοσυντίθεται από κάποιο ενδιάμεσο στάδιο του PhP που δεν εμπλέκεται άμεσα η PAL. Πράγματι, έχει προταθεί πιθανή βιοσύνθεση του PC από το 5-αφυδροξυκυκλικό οξύ σε ενδιάμεσο στάδιο του ShP (Goodwin and Mercer, 1983; Vermerris and Nicholson, 2008). Επιπλέον, προτείνεται ότι τα υδροξυβενζοϊκά μπορούν να παραχθούν και από αποδόμηση των φλαβονοειδών (Strack 1997). Για το EL μπορεί να προταθούν παρόμοιες πορείες βιοσύνθεσης με το PC, δεδομένου ότι η AIP παρεμπόδιζε μερικώς την άνοδο των επιπέδων του EL (υπήρξε αύξηση στον 1<sup>ο</sup> C, αλλά σε μικρότερο βαθμό από τους μάρτυρες). Πράγματι, με τη χρήση ραδιενεργού σικιμικού οξέως και ραδιενεργής φαινυλαλανίνης έχει βρεθεί ότι ακόμα και στο ίδιο φυτικό είδος το EL μπορεί να συντεθεί μέσω και του ShP και του PhP (Ishikura et al., 1984). Επίσης, στα καρύδια υπάρχει μεγάλη περιεκτικότητα ελλαγιταννινών που έχουν στα μόρια τους μονάδες EL (Fukuda et al., 2003; Karamac, 2009a; Karamac, 2009b; Mahoney et al., 2010; Sze-Tao et al., 2001) είναι πιθανό να ελευθερώνονται μόρια EL, και να εξηγείται ένα μέρος της αύξησης που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Τα HB, DHB, VA και SY ήταν τα μόνα που παρατηρήθηκε παρεμπόδιση της αύξησής τους στα σπέρματα που είχαν εμβλαπτιστεί σε AIP, ενώ παράλληλα στους συνδυασμούς ουσιών στους οποίους συμμετείχε η AIP βρέθηκαν επίσης χαμηλές συγκεντρώσεις των οξέων αυτών. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι πιθανά η βιοσύνθεση των HB, DHB, VA και SY είναι PAL-εξαρτώμενη και κατά συνέπεια συμβαίνει μέσω του PhP. Η παρατήρηση αυτή είναι σύμφωνη με την άποψη κατά την οποία μια κύρια πιθανή οδός είναι μέσω του PhP με αποδόμηση της πλευρικής ανθρακικής αλυσίδας των υδροξυκιναμικών και απομάκρυνση ενός οξικού, όπως προαναφέρθηκε (Chakraborty et al., 2009; Sircar and Mitra, 2009). Πρόδρομα υδροξυκιναμικά των υδροξυβενζοϊκών HB, DHB, VA και SY είναι τα *p*-κουμαρικό, 2,4-διδυδροξυκιναμικό (ουμπελικό), φερούλικό και σιναπικό, αντίστοιχα. Στην παρούσα έρευνα, δεν βρέθηκε κάποιο από τα παραπάνω οξέα, παρόλο που οι Colaric et al. (2005) αναφέρουν σε σπέρματα της Franquette ίχνη *p*-κουμαρικού, φερούλικού και σιναπικού σε συγκεντρώσεις 2,9 μg g<sup>-1</sup>, 0,8 μg g<sup>-1</sup> και 0,5 μg g<sup>-1</sup>, αντίστοιχα. Το γεγονός ότι δεν βρέθηκαν τα αντίστοιχα υδροξυκιναμικά στην παρούσα εργασία μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι δεν βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή ή ότι άλλες ενδιάμεσες πρόδρομες ουσίες των υδροξυβενζοϊκών μπορεί να συσσωρεύονται. Πράγματι, μελετώντας τη συσσώρευση του HB σε ρίζες καρότου οι Sircar and Mitra (2009), αναφέρουν ότι για τη μετατροπή του *p*-κουμαρικού σε HB μεσολαβούν διάφορα στάδια και μάλιστα αναφέρουν την 4-υδροξυβενζαλδεΰδη ως την πρόδρομο ουσία που συσσωρεύεται, ενώ το *p*-κουμαρικό δεν βρέθηκε σε ελεύθερη μορφή παρά μόνο συνδεδεμένο στα κυτταρικά τοιχώματα. Μάλιστα στην έρευνά τους βρήκαν παρεμπόδιση της συσσώρευσης HB με την εφαρμογή

παρεμποδιστή δράσης της PAL, φαινόμενο που παρατηρήθηκε και στην παρούσα εργασία. Οι Sircar et al. (2011), με *in vitro* μελέτη της δραστηριότητας διαφόρων ενώσεων βενζοαλδευδών (χ,χ-υδροξυβενζαλδεύδη) ως υποστρώματα για την σύνθεση των αντίστοιχων υδροξυβενζοϊκών οξέων (χ,χ-υδροξυβενζοϊκό οξύ), βρήκαν μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ της δραστηριότητας του κάθε υποστρώματος. Το παραπάνω γεγονός σημαίνει ότι για φαινορικά ακόμα και της ίδιας ομάδας τα διάφορα στάδια της βιοσύνθεσής τους μπορεί να διαφοροποιούνται μεταξύ τους με διάφορους παράγοντες. Από όλα τα παραπάνω γίνεται κατανοητό πόσο πολύπλοκη μπορεί να είναι η βιοσύνθεση των υδροξυβενζοϊκών.

Όπως αναφέρθηκε στην περίπτωση των TP, ακόμα και κατά τη συντήρηση των σπερμάτων στον 1° C, μπορεί να συμβαίνει αποδόμηση (οξειδωση) των φαινολικών παράλληλα με τη σύνθεση. Προς επιβεβαίωση των παραπάνω, μειώσεις της περιεκτικότητας των σπερμάτων σε PCE παρατηρήθηκαν τόσο στο Πείραμα Γ όσο και σε όλες τις επεμβάσεις στο Πείραμα Δ. Επίσης, στο Πείραμα Δ μειώσεις παρατηρήθηκαν και στις συγκεντρώσεις των HB, VA και SY στα σπέρματα που είχαν εμβαπτιστεί σε AIP, γεγονός που δεν αποκλείει οξείδωση όλων των φαινολικών σε συνθήκες 1° C, δεδομένου και ότι οι PPO και POD βρέθηκαν ενεργές. Εξετάζοντας τους μάρτυρες φαίνεται ότι η συσσώρευση (βιοσύνθεση) του κάθε φαινολικού ήταν εντονότερη από την οξειδωσή του, μιας και παρατηρήθηκε τελική αύξηση των επιπέδων τους στα σπέρματα. Για τις λοιπές επεμβάσεις, από τη μελέτη των συγκεντρώσεων των μεμονωμένων φαινολικών φαίνεται πιθανόν ότι οι PPO και POD είχαν δράσει επί της οξειδωσης των VA και PCE, καθώς στις επεμβάσεις που περιόρισαν τις ενεργότητες των ενζύμων αυτών (ACT, COR, CHX και τους συνδυασμούς τους) παρατηρήθηκαν οι μεγαλύτερες αυξήσεις των επιπέδων τους. Από τα παρόντα αποτελέσματα δεν μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την αποικοδόμηση των υπολοίπων φαινολικών ουσιών.

Συμπερασματικά στα καρύδια φαίνεται ότι η βιοσύνθεση των HB, DHB, VA, SY γίνεται μέσω του PhP, η βιοσύνθεση του PC γίνεται μάλλον εκτός του PhP, ενώ στην βιοσύνθεση του EL είναι πιθανόν να συνεισφέρει μερικώς το PhP, τουλάχιστον όταν τα σπέρματα εκτίθενται σε χαμηλή θερμοκρασία. Κατά τον Wildermuth (2006) δεν έχει αποσαφηνιστεί σε ποιους ιστούς και κάτω από ποιες συνθήκες τα δύο κύρια μονοπάτια (PhP, ShP) χρησιμοποιούνται. Η απλή δομή μερικών τουλάχιστον φαινολικών είναι αυτή που καθιστά εξαιρετικά δύσκολη τη μελέτη του μεταβολισμού τους και τις χημικές και λειτουργικές διεργασίες που εμπλέκονται σε αυτόν (Chakraborty et al., 2009; Wildermuth, 2006).

### 3.4.5. Συμπεράσματα

Παρόλο που τα νωπά καρύδια θεωρούνται ανώτερα των αποξηραμένων, από την άποψη των αντιοξειδωτικών, είναι ευπαθή κατά τη συντήρηση και δεν μπορούν να συντηρηθούν ικανοποιητικά περισσότερο από 40 d στον 1° C. Η πτωτική τάση της αναπνοής και η μη παραγωγή αιθυλενίου στις 40 d συντήρησης είναι ένδειξη ότι δεν προκλήθηκε αλλοίωση του προϊόντος (ανάπτυξη μικροοργανισμών) για αυτό το χρονικό διάστημα. Η συντήρηση σπερμάτων με το κέλυφος σε σύγκριση με τα αποκελυφομένα μπορεί να προστατέψει ελαφρά το προϊόν από το καφέτιασμα, αλλά δεν έχει επίδραση επί των αντιοξειδωτικών. Από την άποψη του καφετιάσματος η ποικιλία Chandler φάνηκε να έχει μεγαλύτερη σταθερότητα κατά τη συντήρηση, ενώ η Ιόλη φάνηκε να είναι η πιο ευαίσθητη, παρόλο που αρχικά είχε εξαιρετική ποιότητα από την άποψη του χρώματος. Έτσι φαίνεται ότι για τα νωπά καρύδια είναι πολύ σημαντικό να επιλέγονται ποικιλίες με μικρή ευαισθησία στο καφέτιασμα, γεγονός που καθιστά την έρευνα πολύ ενδιαφέρουσα για αναζήτηση τέτοιων γονότυπων.

Παράλληλα, στο παρόν κεφάλαιο βρέθηκε βελτίωση της θρεπτικής αξίας στον 1° C μέσω της αύξησης των TP, TAC και των μεμονωμένων φαινολικών, η οποία μπορεί να έχει σημαντική πρακτική εφαρμογή. Τα νωπά σπέρματα μπορούν να διατεθούν πλήρη ή ως νωπά με μικρό-επεξεργασία (minimally processed) ή ως διατροφολογικά (functional) ή ως διατροφολογικά (nutraceutical) προϊόντα. Συχνά στη βιομηχανία μεσολαβεί καθυστέρηση μερικών ημερών μεταξύ συγκομιδής και αποξήρανσης των καρυδιών. Με βάση τα παρόντα δεδομένα, αν μέχρι την αποξήρανση οι καρποί εκτεθούν σε χαμηλή θερμοκρασία μπορεί να επιτευχθεί βελτίωση του αντιοξειδωτικού χαρακτήρα του τελικού προϊόντος. Η χρονικά μικρή συντηρησιμότητα των νωπών καρυδιών είναι ένας από τους κύριους λόγους που καθιστά το προϊόν αυτό λιγότερο δημοφιλές στην αγορά, ενώ παράλληλα σε ορισμένες περιπτώσεις η ζήτηση (χρονικά και ποσοτικά) για το προϊόν μπορεί να μην καλύπτεται από την προσφορά. Με βάση τα δεδομένα της παρούσας μελέτης, μπορεί να προταθεί ότι μέρος των νωπών καρυδιών που δεν έχουν διατεθεί μπορούν να αποξηραθούν αργότερα δίνοντας προϊόν βελτιωμένο ως προς τα αντιοξειδωτικά και μειώνοντας τη ζημία του αδιάθετου προϊόντος. Στα νωπά καρύδια, η αύξηση των αντιοξειδωτικών, και ιδιαίτερα των φαινολικών όπως το EL, θα μπορούσε να βρει σημαντική πρακτική εφαρμογή στη βιομηχανία παραγωγής φυσικών αντιοξειδωτικών ή/και τη φαρμακοβιομηχανία. Δεδομένου ότι, από την άποψη των αντιοξειδωτικών, τα καρύδια είναι στην κορυφή τις λίστας των φυτικών προϊόντων, τα νωπά καρύδια υπερέχουν των αποξηραμένων. Έτσι, μπορεί να προκληθεί αύξηση της περιεκτικότητας των αντιοξειδωτικών με έκθεση των καρπών σε θερμοκρασία 1° C και να μεγιστοποιηθεί η απόδοση της παραγωγής φυσικών αντιοξειδωτικών. Περαιτέρω έρευνα για την αύξηση των αντιοξειδωτικών των σπερμάτων καρυδιάς αποτελεί ένα πολύ ενδιαφέρον

πεδίο που θα συντελέσει και στην αύξηση της οικονομικής σημασίας αυτού του φυτικού είδους.

Η αύξηση των αντιοξειδωτικών, κατά την συντήρηση των καρυδιών στον 1° C, προήλθε κύρια από ενεργοποίηση του μεταβολισμού των φαινυλπροπανοειδών και οδήγησε σε αύξηση των φαινολικών οξέων HB, DHB, PC, VA, SY και EL. Παράλληλα, υπό αυτές τις συνθήκες βρέθηκε αύξηση της δραστηριότητας των ενζύμων PAL, PPO και POD η οποία φαίνεται να προήλθε τόσο από την ενεργοποίησή τους όσο και από την *de novo* σύνθεσή τους. Από τη συγκριτική μελέτη όλων των παραπάνω χαρακτηριστικών, σε συνδυασμό με τη χρήση παρεμποδιστικών ουσιών, φάνηκε ότι η βιοσύνθεση των HB, DHB, VA, SY γίνεται μέσω του PhP, η βιοσύνθεση του PC γίνεται μάλλον εκτός του PhP, ενώ στην βιοσύνθεση του EL είναι πιθανόν να συνεισφέρει μερικώς το PhP.



### 3.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- Abeles, F.B., Morgan, P.W., Salveit, M.E., 1992.** Regulation of ethylene production by internal, environmental, and stress factors. In: Ethylene in plant biology 2<sup>nd</sup> edition. *Academic Press, San Diego, USA*, pp. 56-119.
- Amaral, J.S., Seabra, R.M., Andrade, P.B., Valentão, P., Pereira, J.A., Ferreres, F., 2004.** Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves. *Food Chemistry* **88**, 373-379.
- Amarowicz, R., Carle, R., Dongowski, G., Durazzo, A., Galensa, R., Kammerer, D., Maiani, G., Piskula, M.K., 2009.** Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. *Molecular Nutrition & Food Research* **53**, S151-S183.
- Anderson, K.J., Teuber, S.S., Gobeille, A., Cremin, P., Waterhouse, A.L., Steinberg, F.M., 2001.** Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. *Journal of Nutrition* **131**, 2837-2842.
- AOAC, 1995.** Oils and Fats. In: Horwitz, W., (ed.), Official Methods of Analysis, 16th ed. *AOAC, Arlington, VA, USA*, pp. 9-10, 17.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S., Bektaşoğlu, B., Berker, K., Özyurt, D., 2007.** Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* **12**, 1496-1547.
- Appert, C., Zon, J., Amrhein, N., 2003.** Kinetic analysis of the inhibition of phenylalanine ammonia-lyase by 2-aminoindan-2-phosphonic acid and other phenylalanine analogues. *Phytochemistry* **62**, 415-422.
- Arcan, I., Yemenicioglu, A., 2009.** Antioxidant activity and phenolic content of fresh and dry nuts with or without the seed coat. *Journal of Food Composition and Analysis* **22**, 184-188.
- Arranz, S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., 2008.** Antioxidant capacity of walnut (*Juglans regia* L.): contribution of oil and defatted matter. *European Food and Research Technology* **227**, 425-431.
- Ayaz, F.A., Demir, O., Torun, H., Kolcuoglu, Y., Colak, A., 2008.** Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening. *Food Chemistry* **106**, 291-298.
- Ballisteri, G., Arena, E., Fallico, B., 2009.** Influence of ripeness and drying process on the polyphenols and tocopherols of *Pistacia vera* L. *Molecules* **14**, 4358-4369.

- Boo, H.-O., Heo, B.-G., Gorinstein, S., Chon, S.-U.,** 2011. Positive effects of temperature and growth conditions on enzymatic and antioxidant status in lettuce plants. *Plant Science* **181**, 479-484.
- Bradford, M.M.,** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Braga, G.C., Couto, S.M., Hara, T., Almeida Neto, J.T.P.,** 1999. Mechanical behaviour of macadamia nut under compression loading. *Journal of Agricultural Engineering Research* **72**, 239-245.
- Bravo, L.,** 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **56**, 317-333.
- Burton, W.G.,** 1982. Post-harvest physiology of food crops. *Longman, London, UK*, p. 124.
- Buttery, R.G., Light, D.M., Nam, Y., Merrill, G.B., Roitman, J.N.,** 2000. Volatile components of green walnut husks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 2858-2861.
- Cerda, B., Tomas-Barberan, F.A., Espin, J.C.,** 2005. Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: identification of biomarkers and individual variability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 227-235.
- Cecchini, M., Contini, M., Massantini, R., Monarca, D., Moscetti, R.,** 2011. Effects of controlled atmospheres and low temperature on storability of chestnuts manually and mechanically harvested. *Postharvest Biology and Technology* **61**, 131-136.
- Chakraborty, M., Karun, A., Mitra, A.,** 2009. Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. *Journal of Plant Physiology* **166**, 63-71.
- Chen, J.-y., He, L.-h., Jiang, Y.-m., Wang, Y., Joyce, D.C., Ji, Z.-l., Lu, W.-j.,** 2008. Role of phenylalanine ammonia-lyase in heat pretreatment-induced chilling tolerance in banana fruit. *Physiologia Plantarum* **132**, 318-328.
- Cisneros-Zevallos, L.,** 2003. The use of controlled postharvest abiotic stresses as a tool for enhancing the nutraceutical content and adding-value of fresh fruits and vegetables. *Journal of Food Science* **68**, 1560-1565.
- Claudot, A.-C., Ernst, D., Sandermann, H., Drouet, A.,** 1997. Chalcone synthase activity and polyphenolic compounds of shoot tissues from adult and rejuvenated walnut trees. *Planta* **203**, 275-282.

- Colaric, M., Veberic, R., Solar, A., Hudina, M., Stampar, F., 2005.** Phenolic acids, syringaldehyde, and juglone in fruits of different cultivars of *Juglans regia* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 6390-6396.
- Cosmulescu, S., Trandafir, I., Achim, G., Botu, M., Baci, A., Gruia, M., 2010.** Phenolics of green husk in mature walnut fruits. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* **38**, 53-56.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N., 2009.** Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* **26**, 1001-1043.
- Dixon, R.A., Choudhary, A.D., Dalkin, K., Edwards, R., Fahrendorf, T., Gowri, G., Harrison, M.J., Lamb, C.J., Loake, G.J., Maxwell, C.A., Orr, J., Paiva, N.L., 1992.** Molecular biology of stress-induced phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in alfalfa. In: Stafford, H.A., Ibrahim, R.K. (Eds.), Recent advances in phytochemistry Vol. 26. Phenolic metabolism in plants. *Plenum Press, New York, USA* pp. 91-128.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L., 1995.** Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7**, 1085-1097.
- Espín, J.C., van Leeuwen, J., Wichers, H.J., 1999a.** Kinetic study of the activation process of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by serine proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 3509-3517.
- Espín, J.C., Wichers, H.J., 1999b.** Kinetics of activation of latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by benzyl alcohol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 3503-3508.
- Espín, J.C., Wichers, H.J., 2000.** Study of the oxidation of resveratrol catalyzed by polyphenol oxidase. Effect of polyphenol oxidase, laccase and peroxidase on the antiradical capacity of resveratrol. *Journal of Food Biochemistry* **24**, 225-250.
- Francisco, M.L.D.L., Resurrecion, A.V.A., 2008.** Functional Components in Peanuts. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **48**, 715-746.
- Fukuda, T., Ito, H., Yoshida, T., 2003.** Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.). *Phytochemistry* **63**, 795-801.
- Gao, C., Wang, Y., Liu, G., Wang, C., Jiang, J., Yang, C., 2010.** Cloning of ten peroxidase (*POD*) genes from *Tamarix Hispida* and characterization of their responses to abiotic stress. *Plant Molecular Biology Reporter* **28**, 77-89.
- Gîrzu, M., Fraisse, D., Carnat, A.-P., Carnat, A., Lamaison, J.-L., 1998.** High-performance liquid chromatographic method for the determination of juglone in fresh walnut leaves. *Journal of Chromatography A* **805**, 315-318.
- Gómez-Caravaca, A.M., Verardo, V., Segura-Carretero, A., Caboni, M.F., Fernández-Gutiérrez, A., 2008.** Development of a rapid method to determine phenolic and other

- polar compounds in walnut by capillary electrophoresis-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1209**, 238-245.
- Gooding, P.S., Bird, C., Robinson, S.P.**, 2001. Molecular cloning and characterisation of banana fruit polyphenol oxidase. *Planta* **213**, 748-757.
- Goodwin, T.W., Mercer, E.I.**, 1983. Introduction to plant biochemistry 2<sup>nd</sup> ed. *Pergamon Press, Oxford, UK* pp. 528-566.
- Halvorsen, B.L., Carlsen, M.H., Phillips, K.M., Böhn, S.K., Holte, K., Jacobs Jr, D.R., Blomhoff, R.**, 2006. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *American Journal of Clinical Nutrition* **84**, 95-135.
- Halvorsen, B.L., Holte, K., Myhrstad, M.C.W., Barikmo, I., Hvattum, E., Remberg, S.F., Wold, A.-B., Haffner, K., Baugerød, H., Andersen, L.F., Moskaug, Û., Jacobs, D.R., Blomhoff, R.**, 2002. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *Journal of Nutrition* **132**, 461-471.
- Harborne, J.B., Simmonds, N.W.**, 1964. Biochemistry of phenolic compounds. *Academic Press, London, UK* pp. 101.
- Hassan-Beygi, S.R., Aghbashlo, M., Kianmehr, M.H., Massah, J.**, 2009. Drying characteristics of walnut (*Juglans regia* L.) during convection drying. *International Agrophysics* **23**, 129-135.
- Hedin, P.A., Langhans, V.E., Graves, C.H.**, 1979. Identification of juglone in pecan as a possible factor of resistance to *Fusicladium effusum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **27**, 92-94.
- Hendrics, L.C., Coates, W.W., Elkins, R.B., McGranahan, G.H., Phillips, H.A., Ramos, D.E., Reil, W.O., Snyder, R.G.**, 1998. Selection of Varieties. In: Ramos, D.E., (Ed.), Walnut Production Manual. *University of California Press, USA*, pp. 86-89.
- Hori, K., Watanabe, Y.**, 2008. Chapter 8 *in vivo* analysis of plant nonsense-mediated mRNA decay, In: Lynne, E.M., Megerditch, K. (Eds.), *Methods in Enzymology*. *Academic Press, San Diego, USA*, pp. 165-176.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L.**, 2005. The Chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 1841-1856.
- Huh, G.H., Lee, S.J., Bae, Y.S., Liu, J.R., Kwak, S.S.**, 1997. Molecular cloning and characterization of cDNAs for anionic and neutral peroxidases from suspensioncultured-cells of sweet potato and their differential expression in response to stress. *Molecular and General Genetics MGG* **255**, 382-391.
- Humphreys, J.M., Hemm, M.R., Chapple, C.**, 1999. New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a

- multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 10045-10050.
- Hyodo, H., Tanaka, K., Suzuki, T.**, 1991. Wound-induced ethylene synthesis and its involvement in enzyme induction in mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*. *Postharvest Biology and Technology* **1**, 127-136.
- Ishikura, N., Hayashida, S., Tazaki, K.**, 1984. Biosynthesis of gallic and ellagic acids with <sup>14</sup>C-labeled compounds in *Acer* and *Rhus* leaves. *Journal of Plant Research* **97**, 355-367.
- Ito, H., Okuda, T., Fukuda, T., Hatano, T., Yoshida, T.**, 2007. Two novel dicarboxylic acid derivatives and a new dimeric hydrolyzable tannin from walnuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 672-679.
- Janas, K.M., Osiecka, R., Zoń, J.**, 1998. Growth-retarding effect of 2-aminoindan-2-phosphonic acid on *Spirodela punctata*. *Journal of Plant Growth Regulation* **17**, 169-172.
- Jermi, M., Conedera, M., Sieber, T.N., Sassella, A., Schärer, H., Jelmini, G., Höhn, E.**, 2006. Influence of fruit treatments on perishability during cold storage of sweet chestnuts. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**, 877-885.
- Jiménez, M., García-Carmona, F.**, 1999. Myricetin, an antioxidant flavonol, is a substrate of polyphenol oxidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, 1993-2000.
- Jin, P., Zheng, Y., Tang, S., Rui, H., Wang, C.Y.**, 2009. A combination of hot air and methyl jasmonate vapor treatment alleviates chilling injury of peach fruit. *Postharvest Biology and Technology* **52**, 24-29.
- Jolliffe I.T.**, 2002. Principal Component Analysis 2nd ed., *Springer, NY, USA*, pp. 55-187.
- Καλτσίκης, Π.Ι.**, 1989. Γεωργικός πειραματισμός-Παραγοντικά πειράματα (β' έκδοση). *Εκδόσεις Σταμούλης, Πειραιας, Ελλάδα*, σελ. 115-164.
- Καλτσίκης, Π.Ι.**, 1997. Απλά πειραματικά σχέδια. *Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα-Πειραιας, Ελλάδα*, σελ. 116-117.
- Karamać, M.**, 2009a. Chelation of Cu(II), Zn(II), and Fe(II) by tannin constituents of selected edible nuts. *International Journal of Molecular Sciences* **10**, 5485-5497.
- Karamać, M.**, 2009b. In-vitro study on the efficacy of tannin fractions of edible nuts as antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology* **111**, 1063-1071.
- Ketsa, S., Atantee, S.**, 1998. Phenolics, lignin, peroxidase activity and increased firmness of damaged pericarp of mangosteen fruit after impact. *Postharvest Biology and Technology* **14**, 117-124.
- Khanbabaee, K., van Ree, T.**, 2001. Tannins: Classification and definition. *Natural Product Reports* **18**, 641-649.

- Kim, K.-Y., Kwon, H.-K., Kwon, S.-Y., Lee, H.-S., Hur, Y., Bang, J.-W., Choi, K.-S., Kwak, S.-S.,** 2000. Differential expression of four sweet potato peroxidase genes in response to abscisic acid and ethephon. *Phytochemistry* **54**, 19-22.
- Kornsteiner, M., Wagner, K.-H., Elmadfa, I.,** 2006. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chemistry* **98**, 381-387.
- Koyuncu, M.A., Ekinci, K., Gun, A.,** 2004a. The effects of altitude on fruit quality and compression load for cracking of walnuts (*Juglans regia* L.). *Journal of Food Quality* **27**, 407-417.
- Koyuncu, M.A., Ekinci, K., Savran, E.,** 2004b. Cracking characteristics of walnut. *Biosystems Engineering* **87**, 305-311.
- Labavitch, J.M., Heintz, C.M., Rae, H.L., Kader, A.,** 1982. Physiological and compositional changes associated with maturation of 'Kerman' pistachio nuts. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **107**, 688-692.
- Labuckas, D.O., Maestri, D.M., Perelló, M., Martínez, M.L., Lamarque, A.L.,** 2008. Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: Antioxidant activity and interactions with proteins. *Food Chemistry* **107**, 607-612.
- Leinster, E.,** 1981. Biosynthesis of plant quinones. In: Conn, E.E. (Ed.), *Biochemistry of plants*. Academic Press, New York, pp. 403-423.
- Leyva, A., Jarillo, J.A., Salinas, J., Martinez-Zapater, J.M.,** 1995. Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiology* **108**, 39-46.
- Lichanporn, I., Srilaong, V., Wongs-Aree, C., Kanlayanarat, S.,** 2009. Postharvest physiology and browning of longkong (*Aglaia dookkoo* Griff.) fruit under ambient conditions. *Postharvest Biology and Technology* **52**, 294-299.
- Lieberei, R., Biehl, B., Voigt, J.,** 1981. Serological studies on phenolase from spinach leaves. *Phytochemistry* **20**, 2109-2116.
- Li, Tsao, R., Yang, R., Liu, C., Zhu, H., Young, J.C.,** 2006. Polyphenolic profiles and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* var. *cordiformis*) and persian walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 8033-8040.
- Lin, J., Gong, D., Zhu, S., Zhang, L., Zhang, L.,** 2011. Expression of PPO and POD genes and contents of polyphenolic compounds in harvested mango fruits in relation to Benzothiadiazole-induced defense against anthracnose. *Scientia Horticulturae* **130**, 85-89.
- Liu, H., Jiang, W., Bi, Y., Luo, Y.,** 2005. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and

- enhances activity of fruit defense mechanisms. *Postharvest Biology and Technology* **35**, 263-269.
- Luo, Z., Chen, C., Xie, J.**, 2011. Effect of salicylic acid treatment on alleviating postharvest chilling injury of 'Qingnai' plum fruit. *Postharvest Biology and Technology* **62**, 115-120.
- Mahoney, N., Molyneux, R.J.**, 2004. Phytochemical inhibition of aflatoxigenicity in *Aspergillus flavus* by constituents of walnut (*Juglans regia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 1882-1889.
- Mahoney, N., Molyneux, R., Kim, J., Campbell, B., Waiss, A., Hagerman, A.**, 2010. Aflatoxigenesis induced in *Aspergillus flavus* by oxidative stress and reduction by phenolic antioxidants from tree nuts. *World Mycotoxin Journal* **3**, 49-57.
- Manzocco, L., Calligaris, S., Mastrocola, D., Nicoli, M.C., Lerici, C.R.**, 2001. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends in Food Science & Technology* **11**, 340-346.
- Matok, H., Leszczynski, B., Chrzanowski, G., Sempruch, C.**, 2009. Effects of walnut phenolics on germination of dandelion seeds. *Allelopathy Journal* **24**, 177-182.
- McGranahan, G., Leslie, C.**, 1991. Walnuts (*Juglans*). *Acta Horticulturae* **290**, 907-974.
- McGuire, R.**, 1992. Reporting of objective colour measurements. *HortScience* **27**, 1254-1255.
- Mencarelli, F., Anelli, G., Nardin, C., Stingo, C.**, 1982. La conservazione delle castagne mediante l'impiego di atmosfere controllate. *Industrie Alimentari* **21**, 217-220.
- Meyermans, H., Morreel, K., Lapierre, C., Pollet, B., De Bruyn, A., Busson, R., Herdewijn, P., Devreese, B., Van Beeumen, J., Marita, J.M., Ralph, J., Chen, C., Burggraeve, B., Van Montagu, M., Messens, E., Boerjan, W.**, 2000. Modifications in lignin and accumulation of phenolic glucosides in poplar xylem upon down-regulation of caffeoyl-coenzyme a o-methyltransferase, an enzyme involved in lignin biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 36899-36909.
- Meyers, K.J., Watkins, C.B., Pritts, M.P., Liu, R.H.**, 2003. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 6887-6892.
- Morelló, J.-R., Romero, M.-P., Ramo, T., Motilva, M.-J.**, 2005. Evaluation of l-phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic profile in olive drupe (*Olea europaea* L.) from fruit setting period to harvesting time. *Plant Science* **168**, 65-72.
- Moscetti, R., Frangipane, M.T., Monarca, D., Cecchini, M., Massantini, R.**, 2012. Maintaining the quality of unripe, fresh hazelnuts through storage under modified atmospheres. *Postharvest Biology and Technology* **65**, 33-38.

- Müller, W.-U., Leistner, E.,** 1978. Metabolic relation between naphthalene derivatives in *Juglans*. *Phytochemistry* **17**, 1735-1738.
- Nair, R.B., Bastress, K.L., Ruegger, M.O., Denault, J.W., Chapple, C.,** 2004. The *Arabidopsis thaliana* reduced epidermal fluorescence1 gene encodes an aldehyde dehydrogenase involved in ferulic acid and sinapic acid biosynthesis. *The Plant Cell Online* **16**, 544-554.
- Nicoli, M.C., Anese, M., Parpinel, M.,** 1999. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology* **10**, 94-100.
- Ortega-García, F., Peragón, J.,** 2009. The response of phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase and phenols to cold stress in the olive tree (*Olea europaea* L. cv. Picual). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **89**, 1565-1573.
- Osakabe, K., Tsao, C.C., Li, L., Popko, J.L., Umezawa, T., Carraway, D.T., Smeltzer, R.H., Joshi, C.P., Chiang, V.L.,** 1999. Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 8955-8960.
- Park, P.W., Goins, R.E.,** 1994. *In situ* preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *Journal of Food Science* **59**, 1262-1266.
- Park, S.Y., Ryu, S.H., Kwon, S.Y., Lee, H.S., Kim, J.G., Kwak, S.S.,** 2003. Differential expression of six novel peroxidase cDNAs from cell cultures of sweetpotato in response to stress. *Molecular Genetics and Genomics* **269**, 542-552.
- Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L.,** 2008. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology* **46**, 2103-2111.
- Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentão, P., Andrade, P.B., Ferreira, I.C.F.R., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L.,** 2007. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food and Chemical Toxicology* **45**, 2287-2295.
- Podsdek, A.,** 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT - Food Science and Technology* **40**, 1-11.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K.,** 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 4290-4302.
- Qin, G.Z., Tian, S.P., Xu, Y., Wan, Y.K.,** 2003. Enhancement of biocontrol efficacy of antagonistic yeasts by salicylic acid in sweet cherry fruit. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **62**, 147-154.



- Radix, P., Bastien, C., Jay-Allemand, C., Charlot, G., Seigle-Murandi, F.,** 1998. The influence of soil nature on polyphenols in walnut tissues. A possible explanation of differences in the expression of walnut blight. *Agronomie* **18**, 627-637.
- Raimbault, A.-K., Marie-Alphonsine, P.-A., Horry, J.-P., Francois-Haugrin, M., Romuald, K., Soler, A.,** 2011. Polyphenol oxidase and peroxidase expression in four pineapple varieties (*Ananas comosus* L.) after a chilling injury. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 342-348.
- Ribereau-Gayon, P.,** 1972. Plant phenolics. *Oliver and Boyed, Edinburgh, UK* pp. 254.
- Richard-Forget, F.C., Gaillard, F.A.,** 1997. Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by combinations of pear (*Pyrus communis* Cv. Williams) polyphenol oxidase and peroxidase: a Possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 2472-2476.
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W.,** 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* **66**, 401-436.
- Roberts, E., Kutchan, T., Kolattukudy, P.E.,** 1988. Cloning and sequencing of cDNA for a highly anionic peroxidase from potato and the induction of its mRNA in suberizing potato tubers and tomato fruits. *Plant Molecular Biology* **11**, 15-26.
- Rouves, M., Prunet, J.P.,** 2002. Nouvelle technologie pour la conservation des châtaignes. L'atmosphère contrôlée et ses effets. *Infos Ctifl* **186**, 33-35.
- Saijo, R.,** 1983. Pathway of gallic acid biosynthesis and its esterification with catechins in young tea shoots. *Agricultural and Biological Chemistry* **43**, 455-460.
- Sanchez-Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia-Canovas, F., Garcia-Carmona, F.,** 1995. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta* **1247**, 1-11.
- Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D.E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W.C., Green, R., Shen, B., Liu, J.O.,** 2010. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nature Chemical Biology* **6**, 209-217.
- Seigler D.S.,** 1998. Plant secondary metabolism. *Kluwer Academic Publishers, Boston, USA* pp. 94-187.
- Shahidi, F., Naczk, M.,** 2004. Phenolics in food and nutraceuticals. *CRC Press, Florida, USA* pp. 1-14, 61-63.
- Sharma, N., Ghosh, P., Sharma, U.K., Sood, S., Sinha, A.K., Gulati, A.,** 2009. Microwave-assisted efficient extraction and stability of juglone in different solvents from *Juglans regia*: Quantification of six phenolic constituents by validated RP-HPLC and evaluation of antimicrobial activity. *Analytical Letters* **42**, 2592-2609.

- Shimoda, H., Tanaka, J., Kikuchi, M., Fukuda, T., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T., 2008.** Walnut polyphenols prevent liver damage induced by carbon tetrachloride and d-galactosamine: hepatoprotective hydrolyzable tannins in the kernel pellicles of walnut. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 4444-4449.
- Siev, M., Weinberg, R., Penman, S., 1969.** The selective interruption of nucleolar RNA synthesis in hela cells by cordycepin. *The Journal of Cell Biology* **41**, 510-520.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., 1999.** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Cocalteu reagent. *Methods in Enzymology* **299**, 152-178.
- Sircar, D., Mitra, A., 2009.** Accumulation of *p*-hydroxybenzoic acid in hairy roots of *Daucus carota* 2: Confirming biosynthetic steps through feeding of inhibitors and precursors. *Journal of Plant Physiology* **166**, 1370-1380.
- Sircar, D., Mukherjee, C., Beuerle, T., Beerhues, L., Mitra, A., 2011.** Characterization of *p*-hydroxybenzaldehyde dehydrogenase, the final enzyme of *p*-hydroxybenzoic acid biosynthesis in hairy roots of *Daucus carota*. *Acta Physiologiae Plantarum* **33**, 2019-2024.
- Sobell, H.M., 1985.** Actinomycin and DNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **82**, 5328-5331.
- Solar, A., Colaric, M., Usenik, V., Stampar, F., 2006.** Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinones in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Science* **170**, 453-461.
- Solecka, D., Kacperska, A., 2003.** Phenylpropanoid deficiency affects the course of plant acclimation to cold. *Physiologia Plantarum* **119**, 253-262.
- Solomon, E.I., Sundaram, U.M., Machonkin, T.E., 1996.** Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews* **96**, 2563-2606.
- Stampar, F., Solar, A., Hudina, M., Veberic, R., Colaric, M., 2006.** Traditional walnut liqueur - cocktail of phenolics. *Food Chemistry* **95**, 627-631.
- Strack, D., 1997.** Phenolic metabolism. In: Dey, P.M., Harborne, J.B. (Eds.), *Plant biochemistry*. Academic Press, San Diego, USA pp. 387-434.
- Subramanian, N., Venkatesh, P., Ganguli, S., Sinkar, V.P., 1999.** Role of polyphenol oxidase and peroxidase in the generation of black tea theaflavins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 2571-2578.
- Swain, T., Bate-Smith, E.C., 1962.** Flavonoid compounds. In: Florkin, M., Mason, H.S. (Eds.), *Comparative biochemistry Vol III*. Academic Press, New York, USA pp. 755-809.

- Sze-Tao, K.W.C., Schrimpf, J.E., Teuber, S.S., Roux, K.H., Sathe, S.K., 2001.** Effects of processing and storage on walnut (*Juglans regia* L) tannins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**, 1215-1222.
- Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., 2001.** Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**, 853-876.
- Tsantili, E., Gapper, N.E., Arquiza, J.M.R.A., Whitaker, B.D., Watkins, C.B., 2007.** Ethylene and  $\alpha$ -farnesene metabolism in green and red skin of three apple cultivars in response to 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 5267-5276.
- Tsantili, E., Konstantinidis, K., Athanasopoulos P.E., Pontikis, C., 2002.** Effects of postharvest calcium treatments on respiration and quality attributes in lemon fruit during storage. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **77**, 479-484.
- Tsantili, E., Konstantinidis, K., Christopoulos, M.V., Roussos, P.A., 2011.** Total phenolics and flavonoids and total antioxidant capacity in pistachio (*Pistachia vera* L.) nuts in relation to cultivars and storage conditions. *Scientia Horticulturae* **129**, 694-701.
- Verardo, V., Bendini, A., Cerretani, L., Malaguti, D., Cozzolino, E., Caboni, M.F., 2009.** Capillary gas chromatography analysis of lipid composition and evaluation of phenolic compounds by micellar electrokinetic chromatography in italian walnut (*Juglans regia* L.): irrigation and fertilization influence. *Journal of Food Quality* **32**, 262-281.
- Vermerris, W., Nicholson, R., 2008.** Phenolic compound biochemistry. *Springer, New York, USA* pp. 1-24, 48-60, 81-90, 125-126.
- Wen, P.-F., Chen, J.-Y., Kong, W.-F., Pan, Q.-H., Wan, S.-B., Huang, W.-D., 2005.** Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. *Plant Science* **169**, 928-934.
- Werner, R.A., Rossmann, A., Schwarz, C., Bacher, A., Schmidt, H.-L., Eisenreich, W., 2004.** Biosynthesis of gallic acid in *Rhus typhina*: discrimination between alternative pathways from natural oxygen isotope abundance. *Phytochemistry* **65**, 2809-2813.
- Wildermuth M.C., 2006.** Variations on a theme: synthesis and modification of plant benzoic acids. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 288-296.
- Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L., 2004.** Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 4026-4037.
- Yang, J., Liu, R.H., Halim, L., 2009.** Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds. *LWT - Food Science and Technology* **42**, 1-8.

- Yingsanga, P., Srilaong, V., Kanlayanarat, S., Noichinda, S., McGlasson, W.B., 2008.** Relationship between browning and related enzymes (PAL, PPO and POD) in rambutan fruit (*Nephelium lappaceum* Linn.) cvs. Rongrien and See-Chompoo. *Postharvest Biology and Technology* **50**, 164-168.
- Zhang, Z., Liao, L., Moore, J., Wu, T., Wang, Z., 2009.** Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). *Food Chemistry* **113**, 160-165.
- Zhou, Y., Dahler, J.M., Underhill, S.J.R., Wills, R.B.H., 2003.** Enzymes associated with blackheart development in pineapple fruit. *Food Chemistry* **80**, 565-572.
- Zon, J., Amrhein, N., 1992.** Inhibitors of phenylalanine ammonia-lyase: 2-Aminoindan-2-phosphonic acid and related compounds. *Liebigs Annalen der Chemie* **6**, 625-628.
- Zon, J., Szefczyk, B., Sawka-Dobrowolska, W., Gancarz, R., Kucharska-Zon, M., Latajka, R., Amrhein, N., Miziak, P., Szczepanik, W., 2004.** Experimental and *ab initio* calculated structures of 2-aminoindane-2-phosphonic acid, a potent inhibitor of phenylalanine ammonia-lyase, and theoretical studies of its binding to the model enzyme structure. *New Journal of Chemistry* **28**, 1048-1055.

### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

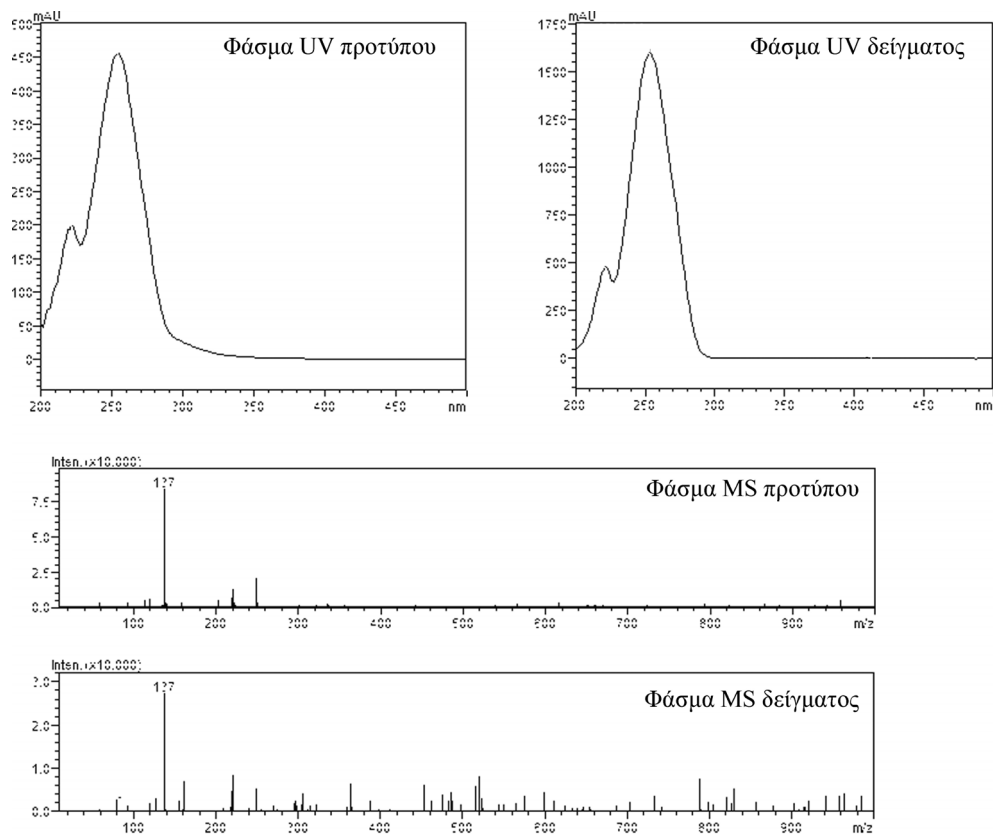
---

**Πίνακας ΙΙΙ.1.** Συνθήκες ανιχνευτή φασμάτων μαζών (MS).

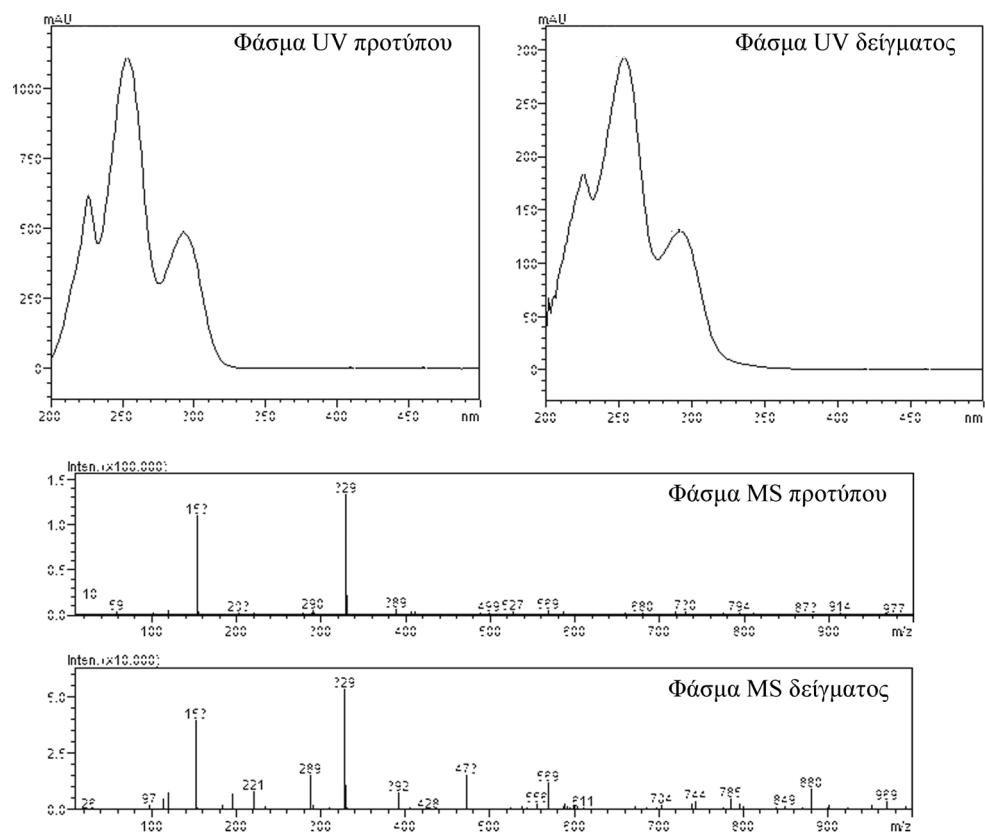
MS	
Acquisition Type	Scan/SIM
Acquisition Time	75 min
Acquisition Mode	Scan (-)
Event Time	0,2 s
Detector Voltage	+1,48 kV
Microscan	0 amu
Threshold	0
Start/End <i>m/z</i>	10-1000
Scan Speed	6000 amu s <sup>-1</sup>
Interface Voltage (Tuning File)	-3,5 kV
CDL Voltage (Tuning File)	-20,0 V
Q-Array Voltage (Tuning File)	DC RF
Interface	
Interface Temperature	-
Interface Current	-13,7 μA
CDL Temperature	250° C
Nebulizing Gas Flow	1 l min <sup>-1</sup>
Heat Block	300° C
PG Vacuum (shutter open)	7,2 x 10 <sup>-4</sup> Pa
IG Vacuum (shutter open)	8,9 x 10 <sup>-4</sup> Pa
Data Acquisition	
LC Stop Time	75 min
Sampling	1,5625 Hz
Time constant	0,640 s
Start/End Time	75 min

Φάσματα UV και MS των φαινολικών συστατικών που ταυτοποιήθηκαν:

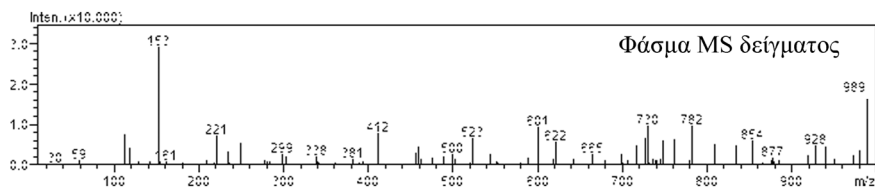
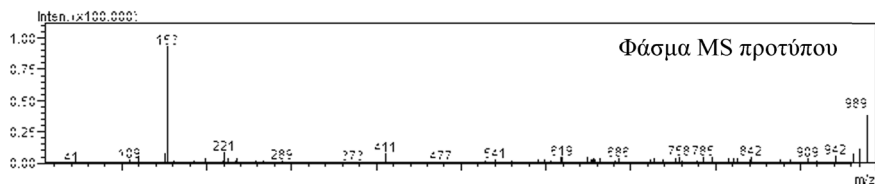
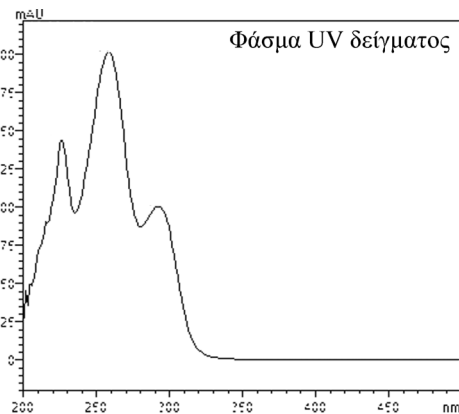
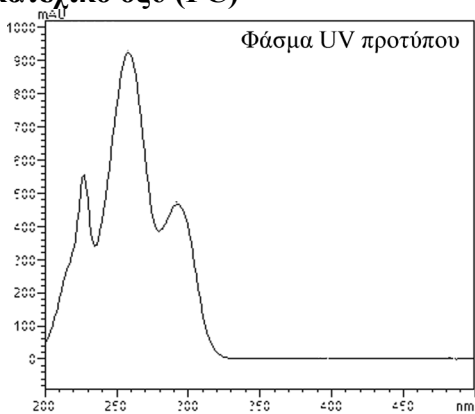
### 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (HB)



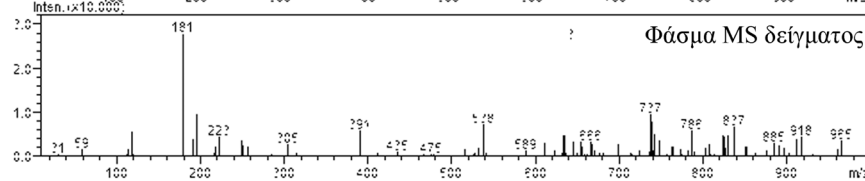
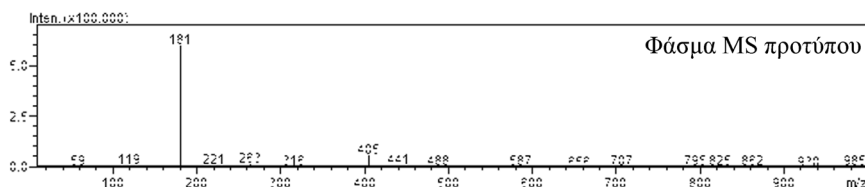
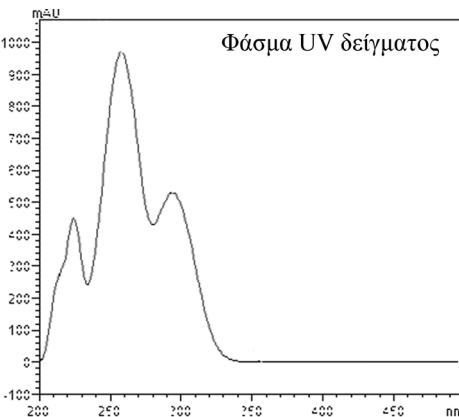
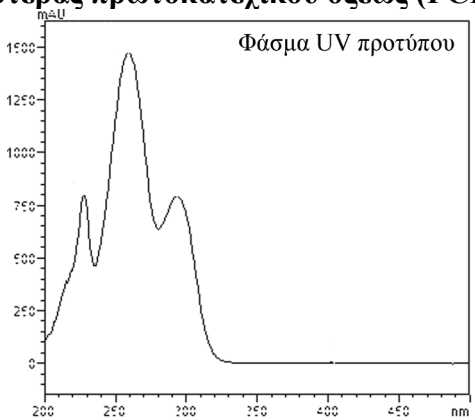
### 2,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ (DHB)



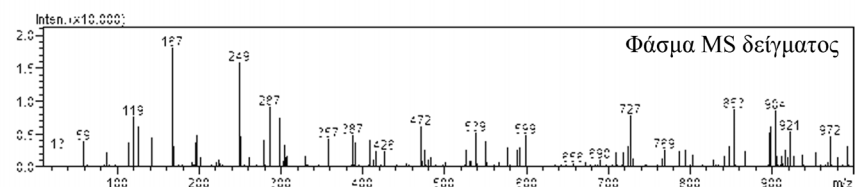
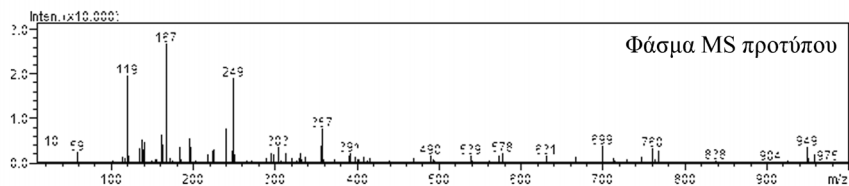
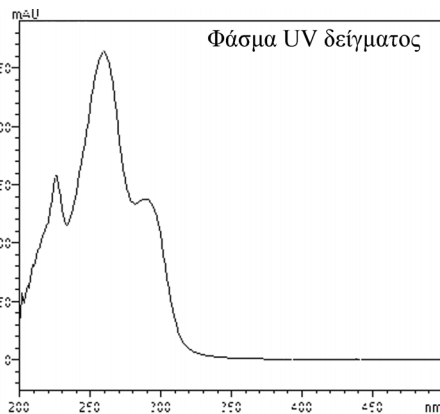
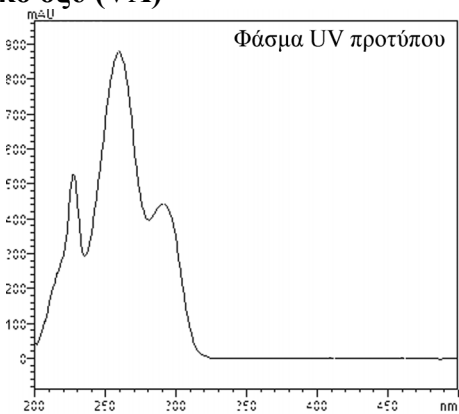
## Πρωτοκατεχικό οξύ (PC)



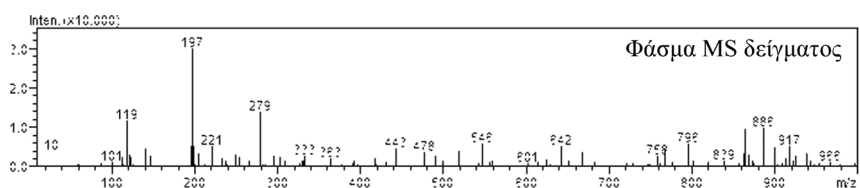
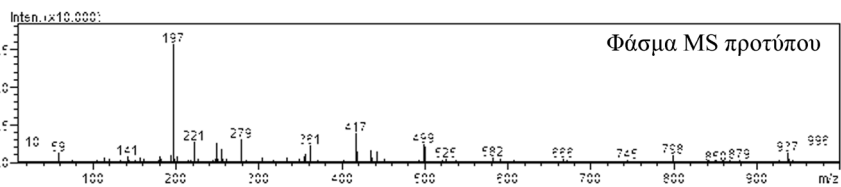
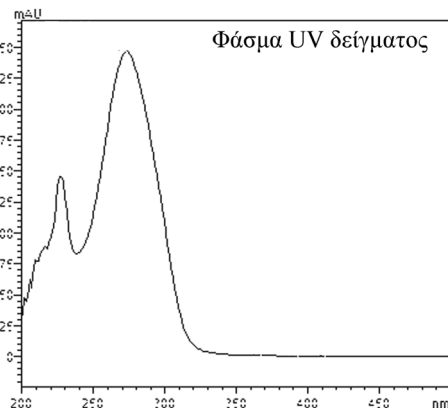
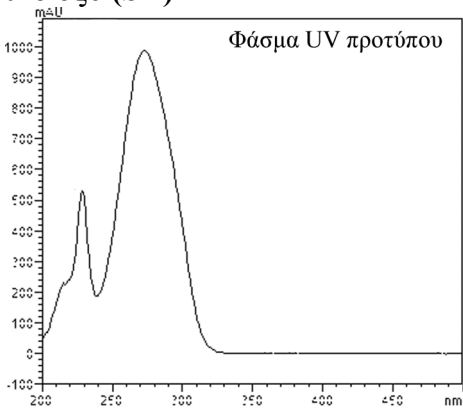
## Αιθυλεστέρως πρωτοκατεχικού οξέως (PCE)



## Βανιλικό οξύ (VA)

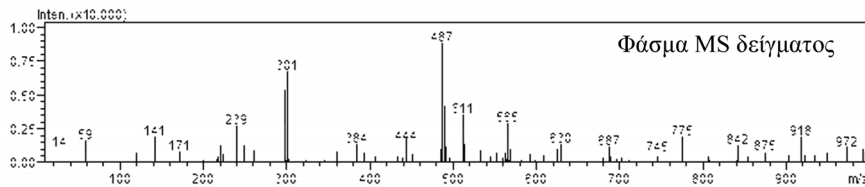
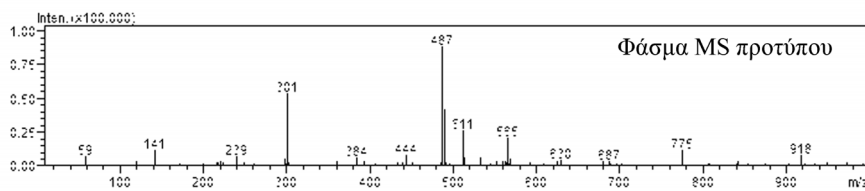
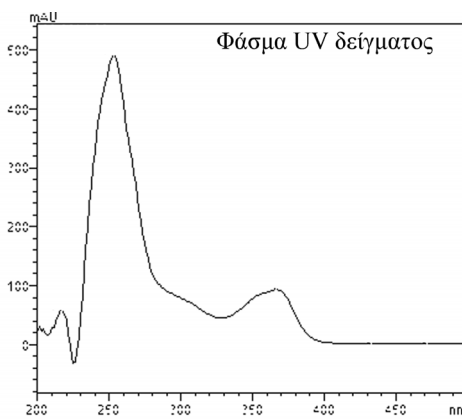
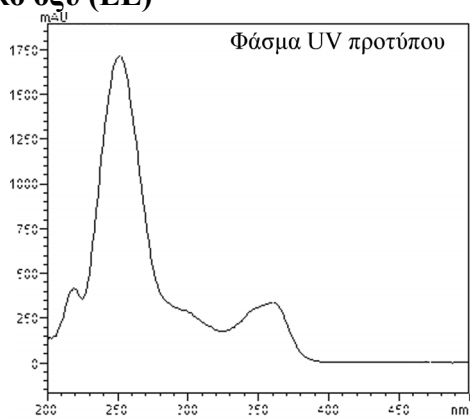


## Συριγγικό οξύ (SY)





# Ελλαγκικό οξύ (EL)





## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

---

*Επίδραση της δακτυλίωσης επί των ποιοτικών και καρπολογικών χαρακτηριστικών των καρυδιών*



## Περίληψη

Η χαραγή-δακτυλίωση αποτελεί μια επέμβαση που έχει εφαρμοστεί και μελετηθεί σε πολλά δενδρώδη είδη, αλλά δεν υπάρχουν στοιχεία για την καρυδιά, όπως επίσης περιορισμένα είναι τα στοιχεία που αφορούν και τις μεταβολές των χαρακτηριστικών κατά την ωρίμανση των καρυδιών. Στο παρόν κεφάλαιο μελετήθηκε η επίδραση της δακτυλίωσης επί των καρπολογικών και ποιοτικών χαρακτηριστικών των νωπών καρπών της καρυδιάς, και ορισμένων χαρακτηριστικών των φύλλων της. Σε δένδρα της ποικιλίας Franquette έγινε δακτυλίωση κλάδων με αφαίρεση δακτυλίου πάχους 1 cm κατά το στάδιο της έναρξης της αύξησης του σπέρματος (15 Ιουλίου). Έγινε οπτικά εκτίμηση του σταδίου ωριμότητας του φορτίου 43 και 84 d μετά την επέμβαση, και κατόπιν συγκομίστηκαν καρποί ίδιου σταδίου ωριμότητας μεταξύ δακτυλίωσης και μαρτύρων για την εκτίμηση των λοιπών χαρακτηριστικών. Παράλληλα στους δύο χρόνους συγκομιδής εξετάσθηκαν ο ρυθμός αφομοίωσης CO<sub>2</sub> (A<sub>CO2</sub>) και τα διαλυτά σάκχαρα (SS) των φύλλων.

Κατά την ωρίμανση των καρπών (1<sup>η</sup> vs 2<sup>η</sup> συγκομιδή) παρατηρήθηκε τάση αύξησης του βάρους και της ελαιοπεριεκτικότητας του σπέρματος, καθώς επίσης των πολύ-ακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) και του λινελαϊκού οξέως (LL) στο καρυδέλαιο. Παράλληλα, τα σπέρματα στην 2<sup>η</sup> συγκομιδή είχαν ελαφρώς πιο καφέ χρωματισμό (μειωμένες τιμές  $L^*$  και  $h^o$ ) από τα σπέρματα στην 1<sup>η</sup> συγκομιδή. Στην πορεία της ωρίμανσης βρέθηκε πτωτική τάση των επιπέδων των ολικών φαινολικών (TP), της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), εκτιμώμενης με τις μεθόδους FRAP και DPPH, ενώ στο καρυδέλαιο πτωτική τάση είχαν τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA) και το παλμιτικό οξύ (PA). Τα επίπεδα των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) και ο βαθμός υπεροξειδίων (PV) στο καρυδέλαιο δεν επηρεάστηκαν από την ημέρα συγκομιδής, όπως επίσης και τα λιπαρά οξέα μυριστικό, παλμιτελαϊκό, στεαρικό, ελαϊκό, βαχενικό, λινολενικό, αραχιδικό και γονδοϊκό. Τόσο στα σπέρματα όσο και στα φύλλα η σακχαρόζη, φρουκτόζη και γλυκόζη είχαν πτωτική τάση στην πορεία του χρόνου, όπως επίσης παρόμοια πτωτική τάση είχε και ο A<sub>CO2</sub> των φύλλων.

Η δακτυλίωση οδήγησε σε πρωίμιση και μεγαλύτερη ομοιομορφία της ωρίμανσης του φορτίου (μικρότερο ποσοστό καρπών με άρτιο περικάρπιο), με αυξημένο βάρος σπέρματος, ποσοστό σπέρματος και αυξημένη ελαιοπεριεκτικότητα. Η δακτυλίωση δεν επηρέασε την ποιότητα του σπέρματος τόσο με βάση κάποια χαρακτηριστικά της αντίληψης του καταναλωτή (χρώμα, FFA, PV), όσο και από την άποψη της θρεπτικής αξίας (TP, TAC, σύσταση καρυδέλαιου σε FA). Επίσης, η δακτυλίωση δεν επέδρασε επί της περιεκτικότητας των SS και του A<sub>CO2</sub> των φύλλων.

Συμπερασματικά, η δακτυλίωση στην καρυδιά μπορεί να εφαρμοστεί σε περιπτώσεις που είναι έντονο το πρόβλημα της ανομοιομορφίας και καθυστέρησης ωρίμανσης του φορτίου, χωρίς να προκαλέσει υποβάθμιση της ποιότητας. Αντίθετα, η δακτυλίωση επιφέρει

βελτίωση της θρεπτικής αξίας δεδομένου ότι εάν συνυπολογιστούν οι αυξήσεις του βάρους και της ελαιοπεριεκτικότητας των σπερμάτων προκύπτει ότι τα σπέρματα που προέρχονται από κλάδους που έχουν χαραχτεί περιέχουν ποσοτικά υψηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικών (TP, TAC) και ουσιωδών λιπαρών οξέων (PUFA, LL, LN).

### 4.1.1. Ωρίμανση-συγκομιδή καρυδιών

Ο καρπός της καρυδιάς είναι δρύπη και αποτελείται από το περικάρπιο και το ξυλοποιημένο ενδοκάρπιο. Εντός του ενδοκαρπίου βρίσκεται το σπέρμα (έμβρυο, ψίχα, εδάδιμο μέρος) το οποίο αποτελείται από το ριζίδιο, το βλαστίδιο και δύο δίλοβες κοτυληδόνες (Ποντίκης, 2000; Prasad, 2003).

Σύμφωνα με τους Pinney et al. (1998), η ανάπτυξη και ωρίμανση του καρπού συμβαίνει 20-22 εβδομάδες μετά την άνθηση, με τις διάφορες φάσεις ανάπτυξης να παρουσιάζουν αρκετές διακυμάνσεις ανάλογα με την περιοχή καλλιέργειας, ενώ η ανάπτυξη των διαφόρων μερών του καρπού γίνεται σε διαφορετικές χρονικές περιόδους. Μια πρώτη ταχεία περίοδος αύξησης συμβαίνει 8-10 εβδομάδες μετά την άνθηση όπου ο καρπός έχει αποκτήσει σχεδόν το πλήρες του μέγεθος και περίπου το 60-70% του νωπού βάρους του. Στο στάδιο αυτό το σπέρμα έχει αποκτήσει περίπου το ήμισυ του μεγέθους του αλλά έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε υγρασία και πολύ χαμηλή ξηρά ουσία. Μετά την περίοδο αυτή αρχίζει η ξυλοποίηση του ενδοκαρπίου και η αύξηση της ξηράς ουσίας του σπέρματος.

Μέχρι την 20-22 εβδομάδα μετά την άνθηση το σπέρμα έχει αποκτήσει το τελικό του μέγεθος και έχει γίνει η εναπόθεση του καρυδέλαιου (Li et al., 2012; Pinney et al., 1998), χαρακτηριστικό που αποτελεί το κύριο συστατικό του, καταλαμβάνοντας περίπου το 60-70% του βάρους του. Από την άποψη της σύστασης του καρυδέλαιου έχει παρατηρηθεί αύξηση του ποσοστού των ακόρεστων λιπαρών οξέων (UFA) και μείωση του ποσοστού των κορεσμένων (SFA) όσο προχωρά η ωρίμανση των καρπών (Greve et al., 1992).

Τα δεδομένα που αφορούν την βιοσύνθεση και διακίνηση των προϊόντων του πρωτογενούς μεταβολισμού στους καρπούς της καρυδιάς είναι περιορισμένα. Οι Li et al. (2012), αναφέρουν τη γλυκόζη, τη φρουκτόζη, τη σακχαρόζη και το άμυλο ως τους κύριους υδατάνθρακες στο σπέρμα της καρυδιάς. Οι ίδιοι ερευνητές μελετώντας τις διακυμάνσεις των συστατικών αυτών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και ωρίμανσης του καρπού αναφέρουν συγκεντρώσεις  $\sim 2-13 \text{ mg g}^{-1} \text{ FW}$ ,  $\sim 4-11 \text{ mg g}^{-1} \text{ FW}$ ,  $\sim 2-14 \text{ mg g}^{-1} \text{ FW}$ ,  $\sim 1,5 \text{ mg g}^{-1} \text{ FW}$  για τη γλυκόζη, τη φρουκτόζη, τη σακχαρόζη και το άμυλο, αντίστοιχα. Τα τρία σάκχαρα είχαν πτωτική τάση κατά το στάδιο της ωρίμανσης ενώ το άμυλο δεν παρουσίασε καμιά μεταβολή καθ' όλη τη διάρκεια ανάπτυξης του σπέρματος.

Η συγκομιδή των καρπών πρέπει να γίνεται όταν το περικάρπιο (hull) αποχωρίζεται εύκολα από το ξυλοποιημένο ενδοκάρπιο (κέλυφος, shell) και ο διαφραγματικός ιστός (packing tissue) που διαχωρίζει τα δύο ημισπέρμια (kernels) έχει αποκτήσει ανοικτό καφέ χρωματισμό (Kader and Thompson, 2002; Ποντίκης, 2000). Μακροσκοπικά το στάδιο αυτό προσδιορίζεται με το σχίσιμο του περικαρπίου, ωστόσο υπάρχουν ορισμένες δυσκολίες όσον

αφορά τον προσδιορισμό του παραπάνω σταδίου. Σε αρκετές περιπτώσεις το σχίσμο του περικαρπίου δεν συμπίπτει πλήρως με το επιθυμητό στάδιο ωριμότητας του σπέρματος, ενώ παράλληλα το σχίσμο αρχίζει να εμφανίζεται και μπορεί να εξελίσσεται για αρκετά μεγάλο διάστημα (3-4 εβδομάδες). Παράλληλα, ταυτόχρονη ωρίμανση όλων των καρπών δεν συμβαίνει επί του δέντρου, με αποτέλεσμα η συγκομιδή να γίνεται πρακτικά όταν περίπου στο 80% των καρπών έχει σχιστεί το περικάρπιο και μπορούν να αποσπαστούν εύκολα.

#### **4.1.2. Φωτοσύνθεση και διαλυτά σάκχαρα των φύλλων της καρυδιάς**

Στα περισσότερα φυτικά είδη, τα επίπεδα της φωτοσύνθεσης είναι χαμηλά στα νεαρά φύλλα, αυξάνουν με την ηλικία των φύλλων μέχρι κάποιο ανώτατο επίπεδο που συμπίπτει όταν ολοκληρώνεται η πλήρης ανάπτυξη του φύλλου και κατόπιν τα επίπεδα μειώνονται στα γηρασμένα φύλλα. Οι διακυμάνσεις στη φωτοσυνθετική ικανότητα των φύλλων σε σχέση με την ηλικία τους έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην παροχή συστατικών του μεταβολισμού στους αναπτυσσόμενους ιστούς (Kramer and Kozlowski, 1979; Loescher et al., 1990). Νωρίς κατά την έναρξη της βλάστησης τα αναπτυσσόμενα φυτικά μέρη εφοδιάζονται με υδατάνθρακες (σάκχαρα και άμυλο) από τα αποθέματα της προηγούμενης περιόδου, ενώ όταν ολοκληρωθεί η ανάπτυξη των φύλλων γίνονται αυτά οι κύριες πηγές σύνθεσης και παροχής υδατανθράκων. Σε κάθε στάδιο της βλαστικής περιόδου το επίπεδο των διαλυτών σακχάρων στα φύλλα είναι αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ της αφομοίωσης του άνθρακα και της διακίνησής του στα λοιπά φυτικά μέρη.

Η φωτοσυνθετική δραστηριότητα των φύλλων επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες ένας από τους οποίους είναι το φορτίο, γεγονός που σημαίνει ότι οι καρποί αποτελούν σημαντικό πόλο έλξης των προϊόντων της φωτοσύνθεσης. Τα δεδομένα της φωτοσύνθεσης των φύλλων της καρυδιάς είναι σχετικά περιορισμένα. Οι Tombesi et al. (1983), αναφέρουν ρυθμό αφομοίωσης CO<sub>2</sub> (A<sub>CO2</sub>) των πλήρως αναπτυγμένων φύλλων της ποικιλίας Serr ~3-13 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, τα επίπεδα του οποίου ήταν εξαρτώμενα από την ένταση της φωτοσυνθετικά ενεργής ακτινοβολίας και της θερμοκρασίας του φύλλου. Σύμφωνα με τους Frak et al. (2001), σε υβρίδιο *J. nigra* × *regia* η φωτοσυνθετική ικανότητα του φύλλου επηρεάζεται από την ηλικία του όπως προαναφέρθηκε, ενώ οι διακυμάνσεις στα επίπεδα φωτοσύνθεσης μεταξύ διαδοχικών ετών εξαρτώνται από την παραλλακτικότητα των κλιματικών και αγρονομικών συνθηκών. Έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα φωτοσύνθεσης της καρυδιάς επηρεάζονται θετικά και από τη λίπανση (N, P, K) (Liu et al., 2010).

Τα δεδομένα που αφορούν την περιεκτικότητα των διαλυτών σακχάρων (SS) στα φύλλα της καρυδιάς είναι περιορισμένα. Έχει παρατηρηθεί ότι τα σάκχαρα γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη στα φύλλα της καρυδιάς παρουσιάζουν μεγάλες διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια της βλαστικής περιόδου (Drossopoulos et al., 1996). Οι παραπάνω



ερευνητές αναφέρουν συγκεντρώσεις γλυκόζης, φρουκτόζης και σακχαρόζης ~0,25-3,5 mg/φύλλο, ~0,25-1,25 mg/φύλλο και ~1-18 mg/φύλλο, αντίστοιχα, με τάση των συγκεντρώσεων και των τριών σακχάρων να μειώνονται προς το τέλος της βλαστικής περιόδου (φθινόπωρο).

#### **4.1.3. Χαραγή-δακτυλίωση**

Η χαραγή ή δακτυλίωση (girdling, ringing) είναι μια τεχνική που εφαρμόζεται σε πολλά είδη καρποφόρων δέντρων με σκοπό την αύξηση της παραγωγικότητας ή/και τη βελτίωση της ποιότητας των καρπών. Συνίσταται χάραξη ή αφαίρεση στενής λωρίδας φλοιού από τον κορμό ή την βάση των βραχιόνων, των υποβραχιόνων (δευτερογενείς, τριτογενείς κ.ο.) και των νεότερων βλαστών. Η χαραγή-δακτυλίωση δεν επηρεάζει ουσιαστικά τον εφοδιασμό της κόμης με νερό, ενώ παράλληλα εμποδίζει την κάθοδο προς το ριζικό σύστημα των οργανικών ουσιών που συντίθενται στα φύλλα. Αποτέλεσμα της λειτουργίας αυτής είναι η δημιουργία τεχνητής συσσώρευσης των προϊόντων του πρωτογενούς ή/και του δευτερογενούς μεταβολισμού πάνω από την τομή.

Αρκετές μελέτες έχουν γίνει όσον αφορά την επίδραση της χαραγής-δακτυλίωσης σε διάφορα είδη καρποφόρων δένδρων. Ο σκοπός για τον οποίο εφαρμόζεται η χαραγή-δακτυλίωση ποικίλει ανάλογα με το επιδιωκόμενο αποτέλεσμα ή/και το πρόβλημα το οποίο πρέπει να αντιμετωπιστεί. Σύμφωνα με έρευνες που έχουν γίνει στο αβοκάντο (Hodgson and Cameron, 1935; Lahav et al., 1971a; Lahav et al., 1971b; Lahav et al., 1986), στη φιστικιά (Crane and Nelson, 1972), στα εσπεριδοειδή (Cohen, 1984; Fischler et al., 1983; Goldshmidt et al., 1982; Monselise et al., 1972; Wallerstein et al., 1974), στην ελιά (Lavee et al., 1983), στην μηλιά (Dennis and Edgerton, 1966; Ferree and Palmer, 1982), στο λίτσι (Menzel and Paxton, 1986), στη ροδακινιά (Andersen and Brodbeck, 1988; Evert and Smittle, 1990) και στη μηλοροδακινιά (Day and Dejong, 1990) η χαραγή-δακτυλίωση επιδρά σε παραμέτρους που σχετίζονται με την άνθηση, την καρποφορία, την παρενιαυτοφορία και την θρεπτική κατάσταση των δένδρων.

#### **3.1.4. Σκοπός κεφαλαίου**

Σκοπός του παρόντος κεφαλαίου ήταν η μελέτη της επίδρασης της δακτυλίωσης επί της ωρίμανσης των καρυδιών, καθώς επίσης επί καρπολογικών και ποιοτικών χαρακτηριστικών των νωπών καρπών. Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με τη συγκεκριμένη επέμβαση στην καρυδιά. Επιλέχθηκε να εξετασθούν, σε δυο συγκομιδές, χαρακτηριστικά που αφορούν τη ποιότητα με βάση την αντίληψη του καταναλωτή (βάρος και χρώμα σπέρματος, FFA, PV), παράλληλα με τα αντιοξειδωτικά και τη σύσταση του καρυδέλαιου που είναι τα κύρια χαρακτηριστικά της διαιτητικής αξίας του προϊόντος. Επίσης, εξετάσθηκαν τα διαλυτά σάκχαρα (SS) των φύλλων και των σπερμάτων, καθώς και ο

ρυθμός αφομοίωσης  $\text{CO}_2$  ( $A_{\text{CO}_2}$ ) των φύλλων, χαρακτηριστικά που εμπλέκονται άμεσα μέσω του πρωτογενούς μεταβολισμού στην σύσταση του σπέρματος.

## **4.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

---

### **4.2.1. Φυτικό υλικό**

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στο παρόν κεφάλαιο προήλθε από δένδρα ποικιλίας Franquette καλλιεργούμενα σε αγρό στην Καρυά της ορεινής Κορινθίας (φ: 38°00'55''B, λ: 22°24'46''A, υψόμετρο 1229 m). Υπό τις παρούσες αγρονομικές συνθήκες η έναρξη της βλάστησης προσδιορίζεται στα μέσα Απριλίου, η εποχή ανθοφορίας θηλέων και ιούλων αρχές-μέσα Μαΐου και τέλη Απριλίου αρχές Μάιου, αντίστοιχα, και η ωρίμανση των καρπών μέσα-τέλη Οκτωβρίου. Τέσσερα δένδρα ηλικίας 12 ετών επισημάνθηκαν ώστε να χρησιμοποιηθούν για το πείραμα που διεξήχθη από τον Ιούλιο έως τον Οκτώβρη του 2009.

### **4.2.2. Πειραματικό σχέδιο και χαρακτηριστικά των καρπών που αξιολογήθηκαν**

Σε κάθε ένα από τα δένδρα επισημάνθηκαν (15/7/2009) 12 κλάδοι ηλικίας 4 ετών από τους οποίους έγιναν οι δειγματοληψίες. Επιλέχθηκαν κλάδοι οι οποίοι έφεραν το ίδιο περίπου φορτίο (~30 καρπούς) και όλοι οι επιλεγμένοι κλάδοι για κάθε δένδρο περιελάμβαναν περίπου το 40-50% του συνολικού φορτίου του δένδρου. Στους μισούς κλάδους από τους συνολικά επιλεγμένους κάθε δένδρου (6) εφαρμόστηκε επέμβαση δακτυλίωσης, ενώ οι υπόλοιποι κλάδοι αποτέλεσαν τους μάρτυρες. Η δακτυλίωση έγινε με αφαίρεση δακτυλίου φλοιού πάχους 1 cm. Έγιναν δύο δειγματοληψίες-συγκομιδές στις 28/8/2009 και τις 8/10/2009. Σε κάθε δειγματοληψία, για κάθε δένδρο, σε τρεις από τους έξι κλάδους που είχαν επισημανθεί για κάθε επέμβαση έγινε οπτική εκτίμηση του σταδίου ωριμότητας των καρπών. Ακολούθως, μετρήθηκε ο  $A_{CO_2}$  των φύλλων και κατόπιν έγινε συλλογή φύλλων και καρπών για την εκτίμηση των υπόλοιπων χαρακτηριστικών. Συγκομίστηκαν περίπου 20 καρποί συνολικά από τους τρεις επιλεγμένους κλάδους (~7 καρποί/κλάδο) ώστε να περιοριστεί η επίδραση του αραιώματος του φορτίου στην επόμενη δειγματοληψία. Σε κάθε δειγματοληψία το φυτικό υλικό συλλέχθηκε από διαφορετικούς κλάδους.

Ο προσδιορισμός του σταδίου ωριμότητας των καρυδιών έγινε με βάση την έκταση του σχισίματος του περικαρπίου και ορίστηκαν τέσσερις κατηγορίες: 0% σχισμένο περικάρπιο (κατηγορία 1), 1-50% σχισμένο περικάρπιο (κατηγορία 2), 50-100% σχισμένο περικάρπιο (κατηγορία 3), πτώση καρπού ή ενδοκαρπίου (κατηγορία 4). Για την εκτίμηση της καρπόπτωσης έγινε τοποθέτηση διχτυού κάτω από τον κάθε κλάδο. Στην πρώτη δειγματοληψία σε όλες τις επεμβάσεις υπήρχαν καρποί μόνο της κατηγορίας 1 από τους οποίους έγινε και η δειγματοληψία. Στην δεύτερη δειγματοληψία υπήρχαν καρποί όλων των κατηγοριών αλλά συγκομίστηκαν καρποί μόνο της κατηγορίας 3 οι οποίοι αντιστοιχούν στο

στάδιο της πλήρους ωριμότητας. Παράλληλα σε κάθε χρόνο συγκομιδής έγινε και δειγματοληψία φύλλων από καρποφόρους βλαστούς του κάθε κλάδου.

Εξετάστηκαν οι επιδράσεις του χρόνου συγκομιδής (δύο επίπεδα) και της επέμβασης (δύο επίπεδα) επί του ποσοστού ωριμότητας των καρπών επί του δέντρου, καθώς και επί των χαρακτηριστικών των καρπών. Συγκεκριμένα, στους καρπούς εξετάστηκαν: το βάρος ολόκληρου του ενδοκαρπίου (ΟΕ), το βάρος του σπέρματος και το ποσοστό του σπέρματος. Παράλληλα μελετήθηκε η περιεκτικότητα σε υγρασία, το χρώμα, τα ολικά φαινολικά, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και το ποσοστό καρυδέλαιου του σπέρματος, καθώς επίσης τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, ο βαθμός υπεροξειδίων και το προφίλ των λιπαρών οξέων του καρυδέλαιου.

Το πείραμα σχεδιάστηκε ως παραγοντικό κατά το εντελώς τυχαιοποιημένο σχέδιο (Καλτσίκης, 1989). Για κάθε συνδυασμό των παραγόντων και των επιπέδων τους χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις επαναλήψεις ( $n = 4$ ).

#### **4.2.3. Αποφλοιώση-διαλογή καρπών**

Οι καρποί που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πειραματικό μέρος δεν είχαν υποστεί αποξήρανση. Η αποφλοιώση των καρπών έγινε με το χέρι και χρησιμοποιήθηκαν μόνο υγιείς καρποί που είχαν τυπικά χαρακτηριστικά.

#### **4.2.4. Μετρήσεις ποιοτικών-καρπολογικών χαρακτηριστικών**

##### **4.2.4.1. Βάρος καρπών**

Το βάρος του ΟΕ, το βάρος του σπέρματος και το ποσοστό του σπέρματος έγιναν όπως περιγράφονται στην παράγραφο 3.2.4.1 του τρίτου κεφαλαίου. Επειδή κατά το χρόνο που διενεργήθηκε η πρώτη δειγματοληψία δεν ήταν δυνατός ο εύκολος αποχωρισμός του περικαρπίου από το ενδοκάρπιο, εξετάστηκε μόνο το βάρος του σπέρματος.

##### **4.2.4.2. Υγρασία και ελαιοπεριεκτικότητα σπέρματος**

Η μέτρηση της υγρασίας και της ελαιοπεριεκτικότητας του σπέρματος πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.5.1 του δεύτερου κεφαλαίου.

##### **4.2.4.3. Χρώμα σπέρματος**

Η μέτρηση του χρώματος του σπέρματος πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.5.5.2 του δεύτερου κεφαλαίου.

#### **4.2.5. Εκτίμηση αντιοξειδωτικών ουσιών των καρπών**

##### **4.2.5.1. Εκχύλιση αντιοξειδωτικών ουσιών**

Η εκχύλιση των αντιοξειδωτικών ουσιών από τα σπέρματα πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6.1 του δευτέρου κεφαλαίου.

##### **4.2.5.2. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών**

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών (TP) πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6.2 του δευτέρου κεφαλαίου.

##### **4.2.5.3. Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας**

Ο προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6.3 του δευτέρου κεφαλαίου.

#### **4.2.6. Προσδιορισμός διαλυτών σακχάρων**

##### **4.2.6.1. Εκχύλιση διαλυτών σακχάρων**

Η εκχύλιση των διαλυτών σακχάρων (SS) έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Meyer and Terry (2008) η οποία περιλαμβάνει δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο 1 g λυοφυλιωμένου και κονιορτοποιημένου ιστού τοποθετήθηκε σε σωλήνα (50 ml) που περιείχε 10 ml εξανίου όπου παρέμεινε για 1 min. Στη συνέχεια έγινε ομογενοποίηση σε συσκευή Ultra-Turrax για 1 min (30 s στις 9500 rpm και 30 s στις 13500 rpm) και ακολούθησε διήθηση σε χωνί τύπου büchner (90 mm i.d.) με προζυγισμένο διηθητικό χαρτί Whatman # 1. Έγινε συλλογή του στερεού υπολείμματος από το διηθητικό χαρτί και ακολούθησε ομογενοποίηση εκ νέου με 10 ml εξανίου, διαδικασία που επαναλήφθηκε συνολικά δύο φορές. Μετά το τέλος των ομογενοποιήσεων το διηθητικό χαρτί με το υπόλειμμα του ιστού παρέμεινε σε θερμοκρασία 25-30° C ώστε να απομακρυνθεί το εξάνιο (~2 h), έγινε προσδιορισμός της ποσότητας του υπολείμματος ( $\Delta B = \text{Τελικό βάρος} - \text{Αρχικό βάρος διηθητικού χαρτιού}$ ) και κατόπιν λήψη του υπολείμματος.

Το δεύτερο στάδιο της εκχύλισης έγινε με προσθήκη 80 mg υπολείμματος σε σφραγιζόμενο φιαλίδιο τύπου erpendorf (1,5 ml) που περιείχε 1 ml διπλά απεσταγμένου νερού (DDW) και ακολούθησε ανάδευση για 20 s. Στη συνέχεια έγινε επώαση σε υδατόλουτρο, στους 55° C για 20 min, κατά την οποία γινόταν ανάδευση κάθε 5 min. Μετά το πέρας της επώασης έγινε φυγοκέντρηση στα 4000 g για 4 min. Τέλος γινόταν λήψη της υπερκείμενης φάσης, διήθηση της μέσω φίλτρου (0,2 μm) και ακολουθούσε η χρωματογραφική ανάλυση των διαλυτών σακχάρων.

#### **4.2.6.2. Ανάλυση διαλυτών σακχάρων**

Η ανάλυση των SS έγινε με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Το σύστημα HPLC αποτελούνταν από ισοκρατική αντλία Waters 510 (Waters, Milford, USA), ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (Refractive Index, RI) (HP 1047A, Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) και σύστημα επεξεργασίας δεδομένων (Peak Simple 3.25). Ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος έγινε σε στήλη ανταλλαγής κατιόντων (cation exchange) Hamilton HC-75 8-10  $\mu\text{m}$ , 7,8 mm  $\times$  305 mm (Hamilton, Nevada, USA) μορφής ασβεστίου ( $\text{Ca}^{++}$ ) σε θερμοκρασία 80° C. Η κινητή φάση ήταν DDW, έγινε ισοκρατική έκλουση με ροή 0,6 ml min<sup>-1</sup> και ο όγκος έγχυσης του δείγματος ήταν 20  $\mu\text{l}$ . Η ταυτοποίηση του κάθε συστατικού έγινε κατόπιν σύγκρισης των κορυφών του δείγματος με πρότυπες ουσίες. Προσδιορίστηκαν τα σάκχαρα γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη, και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mg σακχάρου ανά g DW.

#### **4.2.7. Εκτίμηση χαρακτηριστικών του καρυδέλαιου των καρπών**

##### **4.2.7.1. Εξαγωγή καρυδέλαιου**

Η εξαγωγή του καρυδέλαιου πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.7.1 του δευτέρου κεφαλαίου.

##### **4.2.7.2. Προσδιορισμός ελεύθερων λιπαρών οξέων**

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας του καρυδέλαιου σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA, Free fatty acids) πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.7.2 του δευτέρου κεφαλαίου.

##### **4.2.7.3. Προσδιορισμός βαθμού υπεροξειδίων**

Ο προσδιορισμός του βαθμού υπεροξειδίων (PV, Peroxide value) του καρυδέλαιου πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.7.3 του δευτέρου κεφαλαίου.

##### **4.2.7.4. Προσδιορισμός του προφίλ των λιπαρών οξέων**

Η ανάλυση της σύστασης του καρυδέλαιου σε λιπαρά οξέα (FA) πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.7.4 του δευτέρου κεφαλαίου.

#### **4.2.7. Μετρήσεις χαρακτηριστικών φύλλων**

##### **4.2.7.1. Μέτρηση ρυθμού αφομοίωσης CO<sub>2</sub> (Φωτοσύνθεση)**

Η μέτρηση του ρυθμού αφομοίωσης CO<sub>2</sub> των φύλλων έγινε με κλειστό φορητό σύστημα φωτοσύνθεσης με αναλυτή υπερύθρων (Infrared Gas Analyzer, IRGA). Χρησιμοποιήθηκε το όργανο CIRAS-1 (PP Systems, Herts, UK) εφοδιασμένο με θάλαμο

κυκλικής διατομής εμβαδού  $2,5 \text{ cm}^2$ . Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν μεταξύ 10 π.μ. και 12 π.μ. Η φωτοσυνθετική ενεργός ακτινοβολία (PAR) ήταν  $\sim 1300-1700 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-2}$ , η συγκέντρωση του  $\text{CO}_2$  ρυθμίστηκε στα  $\sim 300-310 \text{ ppm}$  και η ροή του αέρα στο θάλαμο του οργάνου ήταν  $200 \text{ ml min}^{-1}$ . Η θερμοκρασία του φύλλου ήταν  $24-26^\circ \text{ C}$  την 1<sup>η</sup> ημερομηνία μέτρησης και  $14-18^\circ \text{ C}$  τη 2<sup>η</sup>.

Σε κάθε ημερομηνία μετρήθηκε ο ρυθμός αφομοίωσης  $\text{CO}_2$  σε 8 ακραία φύλλα ανά επέμβαση (2 φύλλα ανά δένδρο ανά επέμβαση) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

#### **4.2.7.2. Προσδιορισμός διαλυτών σακχάρων**

Ο προσδιορισμός των διαλυτών σακχάρων (SS) των φύλλων έγινε όπως περιγράφεται στις παραγράφους 4.2.6.1 και 4.2.6.2. του παρόντος κεφαλαίου.

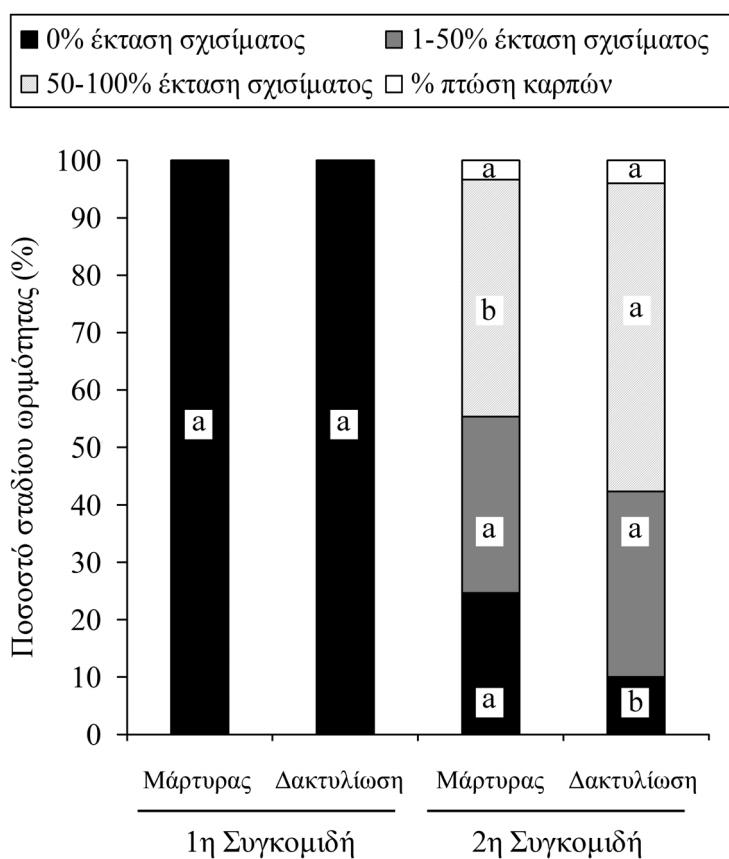
#### **3.2.9. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων**

Η επίδραση των παραγόντων (χρόνος συγκομιδής, επέμβαση), επί των χαρακτηριστικών που εξετάστηκαν εκτιμήθηκε με δι-παραγοντική ανάλυση της διασποράς (ANOVA). Για τα χαρακτηριστικά που εκτιμήθηκαν μόνο στην δεύτερη δειγματοληψία, εξετάστηκε η επίδραση της επέμβασης με μόνο-παραγοντική ANOVA. Οι συγκρίσεις των μέσων και για όλες τις αναλύσεις έγιναν με βάση τη μέθοδο της έντιμης σημαντικής διαφοράς (HSD, Honest Significant Difference) της μεθόδου Tukey-HSD. Το ποσοστό ωριμότητας των καρπών αναλύθηκε με τη δοκιμασία του  $\chi^2$  και οι διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων εξετάστηκαν με τη δοκιμασία Wilcoxon/Kruskal-Wallis για κάθε μία από τις κατηγορίες ωριμότητας. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με το λογισμικό JMP 7.0.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

### 4.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 4.3.1. Ποσοστό ωριμότητας καρπών και καρπολογικά χαρακτηριστικά

Στην πρώτη συγκομιδή όλοι οι καρποί είχαν μη-σχισμένο περικάρπιο, ενώ κατά την δεύτερη συγκομιδή υπήρχαν καρποί σε διάφορα στάδια ωριμότητας (Γράφημα 1.1). Συγκεκριμένα, κατά τη δεύτερη συγκομιδή, οι καρποί στο μεγαλύτερο ποσοστό τους (~70-80%) εμφάνιζαν σχίσσιμο στο περικάρπιο, ενώ ~10-20% των καρπών έφεραν ακόμα άρτιο περικάρπιο. Η καρπόπτωση, σε καμιά περίπτωση, δεν ξεπέρασε το επίπεδο του 5%. Διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ μάρτυρα και δακτυλίωσης όσον αφορά τους καρπούς κατηγορίας 1 με 0% έκταση σχισίματος ( $\chi^2 < 0,05$ ) και κατηγορίας 2 με 50-100% έκταση σχισίματος ( $\chi^2 < 0,05$ ). Ο μάρτυρας υπερείχε ως προς το ποσοστό καρπών της κατηγορίας 1, ενώ η δακτυλίωση οδήγησε με μεγαλύτερο ποσοστό καρπών κατηγορίας 2. Στις άλλες δύο κατηγορίες ωριμότητας δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ( $\chi^2 > 0,05$ ).



**Γράφημα 4. 1.** Ποσοστά των σταδίων ωριμότητας των καρπών καρυδιάς ποικιλίας Franquette συγκομισμένους σε δύο χρόνους από κλάδους που είχαν δεχτεί επέμβαση ή όχι με δακτυλίωση. Οι τιμές μεταξύ μαρτύρων και δακτυλίωσης, για το κάθε στάδιο ωριμότητας και την κάθε δειγματοληψία, που μοιράζονται τα ίδια πεζά γράμματα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά με βάση τη δοκιμασία  $\chi^2$  του Wilcoxon/Kruskal-Wallis.

Μεταξύ όλων των δειγμάτων το βάρος των ΟΕ και του σπέρματος ήταν ~13,2-13,9 g και ~4,8-7,2 g, αντίστοιχα, ενώ το ποσοστό του σπέρματος κυμάνθηκε από 47,2 έως 51,7% (Πίνακας 4.1). Η δακτυλίωση επηρέασε σημαντικά το βάρος και το ποσοστό του σπέρματος



οδηγώντας σε αυξημένες τιμές. Η οψιμότερη συγκομιδή έδωσε καρπούς με μεγαλύτερο βάρος σπέρματος σε σχέση με την 1<sup>η</sup> συγκομιδή. Κρίνεται σκόπιμο να αναφερθεί ότι κατά το χρόνο εφαρμογής της επέμβασης (15/7/2009) το σπέρμα ήταν ελάχιστα ανεπτυγμένο (1,25 g).

**Πίνακας 4. 1.** Χαρακτηριστικά ολόκληρων ενδοκαρπίων (OE) και σπερμάτων καρυδιών της ποικιλίας Franquette σε δύο συγκομιδές υπό την επίδραση επέμβασης δακτυλίωσης.

Συγκομιδή	Επέμβαση	Βάρος OE (g)	Βάρος σπέρματος (g)	% σπέρμα (w/w)	Υγρασία σπέρματος (% w/w FW)	Ελαιοπεριεκτικότητα σπέρματος (% w/w DW)
1η	Μάρτυρας	-	4,76 <sup>d</sup>	-	41,3 <sup>a</sup>	51,5 <sup>d</sup>
	Δακτυλίωση	-	5,62 <sup>c</sup>	-	38,6 <sup>ab</sup>	55,4 <sup>c</sup>
2η	Μάρτυρας	13,21 <sup>at</sup>	6,24 <sup>b</sup>	47,2 <sup>b</sup>	36,0 <sup>bc</sup>	65,3 <sup>b</sup>
	Δακτυλίωση	13,95 <sup>a</sup>	7,20 <sup>a</sup>	51,7 <sup>a</sup>	34,4 <sup>c</sup>	72,0 <sup>a</sup>
<i>Ph</i> <sup>††</sup>		-	***	-	***	***
<i>Ptr</i>		NS	***	*	*	***
<i>Ph</i> × <i>tr</i>		-	NS	-	NS	NS

† Οι μέσοι της κάθε μεταβλητής ακολουθούμενοι από το ίδιο πεζό γράμμα εντός της στήλης, δεν διαφέρουν σημαντικά με βάση την μόνο- ή δι-παραγοντική ANOVA κατά περίπτωση.

†† Πιθανότητα της επίδρασης της συγκομιδής (*Ph*), της επέμβασης (*Ptr*) και της αλληλεπίδρασής τους (*Ph* × *tr*). NS μη σημαντικό, \* σημαντικό  $P < 0,05$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

Η υγρασία των σπερμάτων ήταν ~34-41% και παρουσιάστηκε μειωμένη τόσο στην όψιμη συγκομιδή όσο και στους καρπούς των κλάδων που είχαν δεχτεί δακτυλίωση (Πίνακας 4.1). Η ελαιοπεριεκτικότητα, κυμαινόμενη από 52% έως 72%, είχε αυξανόμενη τάση όσο προχωρούσε η ωρίμανση, ενώ σε κάθε συγκομιδή η δακτυλίωση οδήγησε σε σπέρματα αυξημένης ελαιοπεριεκτικότητας (Πίνακας 4.1).

### 4.3.2. Χρώμα σπέρματος

Οι τιμές των παραμέτρων του χρώματος των σπερμάτων και στις δύο συγκομιδές ήταν ~63-66 για το  $L^*$ , ~83-84 για το  $h^o$  και ~30-33 για το  $C^*$  (Πίνακας 4.2).

Οι παράμετροι  $L^*$  και  $h^o$  είχαν πτωτική τάση με την πάροδο του χρόνου συγκομιδής, σε αντίθεση με την παράμετρο  $C^*$  η οποία ήταν αυξημένη στην δεύτερη συγκομιδή (Πίνακας 4.2). Η επίδραση της επέμβασης ήταν σημαντική μόνο επί της παραμέτρου  $L^*$  με την κύρια επίδραση να αποκαλύπτει υψηλότερες τιμές για τους μάρτυρες σε σχέση με την δακτυλίωση. Ωστόσο, σε κάθε συγκομιδή το  $L^*$  μεταξύ των επεμβάσεων δεν διέφερε.

**Πίνακας 4. 2.** Παράμετροι  $L^*$ ,  $h^o$  και  $C^*$  του χρώματος των σπερμάτων καρυδιών της ποικιλίας Franquette σε δύο συγκομιδές υπό την επίδραση επέμβασης δακτυλίωσης.

Συγκομιδή	Επέμβαση	$L^*$	$h^o$	$C^*$
1η	Μάρτυρας	65,78 <sup>af</sup>	84,29 <sup>ab</sup>	29,98 <sup>b</sup>
	Δακτυλίωση	64,73 <sup>a</sup>	84,81 <sup>a</sup>	31,07 <sup>ab</sup>
2η	Μάρτυρας	63.89 <sup>ab</sup>	83,45 <sup>b</sup>	32,62 <sup>a</sup>
	Δακτυλίωση	62.68 <sup>b</sup>	83,03 <sup>b</sup>	32,39 <sup>a</sup>
$Ph$ <sup>††</sup>		**	***	***
$Ptr$		*	NS	NS
$Ph \times tr$		NS	NS	NS

† Οι μέσοι της κάθε μεταβλητής ακολουθούμενοι από το ίδιο πεζό γράμμα εντός της στήλης, δεν διαφέρουν σημαντικά με βάση την δι-παραγοντική ANOVA.

†† Πιθανότητα της επίδρασης της συγκομιδής ( $Ph$ ), της επέμβασης ( $Ptr$ ) και της αλληλεπίδρασής τους ( $Ph \times tr$ ). NS μη σημαντικό, \* σημαντικό  $P < 0,05$ , \*\* σημαντικό  $P < 0,01$  \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

### 4.3.3. Ολικά φαινολικά (TP) και ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) σπέρματος

Κατά την πρώτη συγκομιδή η συγκέντρωση των TP στα σπέρματα ήταν 28,7 και 29,7 mg GAE g<sup>-1</sup> DW στον μάρτυρα και την δακτυλίωση, αντίστοιχα (Γράφημα 4.2).

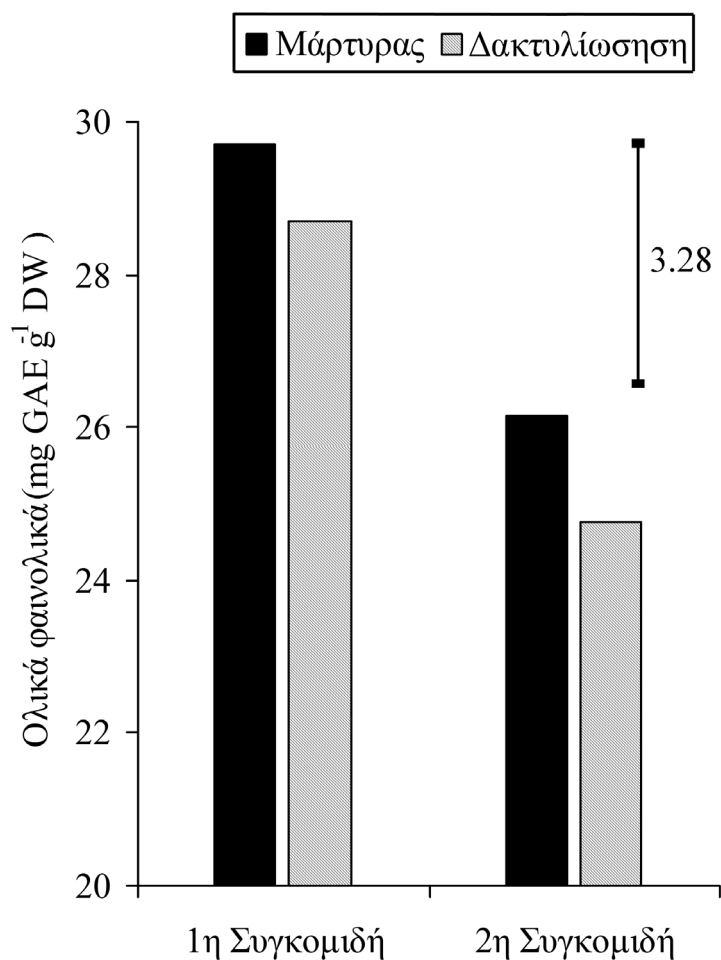
Ο χρόνος συγκομιδής είχε σημαντική επίδραση επί των επιπέδων των TP οδηγώντας σε μειωμένες τιμές στην δεύτερη συγκομιδή σε σχέση με την πρώτη (Γράφημα 4.2, Πίνακας 4.3). Αντίθετα, η επέμβαση δεν επηρέασε τα επίπεδα των TP, καθώς δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των σπερμάτων του μάρτυρα και της δακτυλίωσης.

**Πίνακας 4. 3.** Πιθανότητες των επιδράσεων της συγκομιδής ( $Ph$ ), της επέμβασης ( $Ptr$ ) και της αλληλεπίδρασής τους ( $Ph \times tr$ ) επί των ολικών φαινολικών (TP) και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), εκτιμούμενης με τις μεθόδους FRAP και DPPH, (Γραφήματα 4.2 και 4.3), στα σπέρματα καρυδιών της ποικιλίας Franquette.

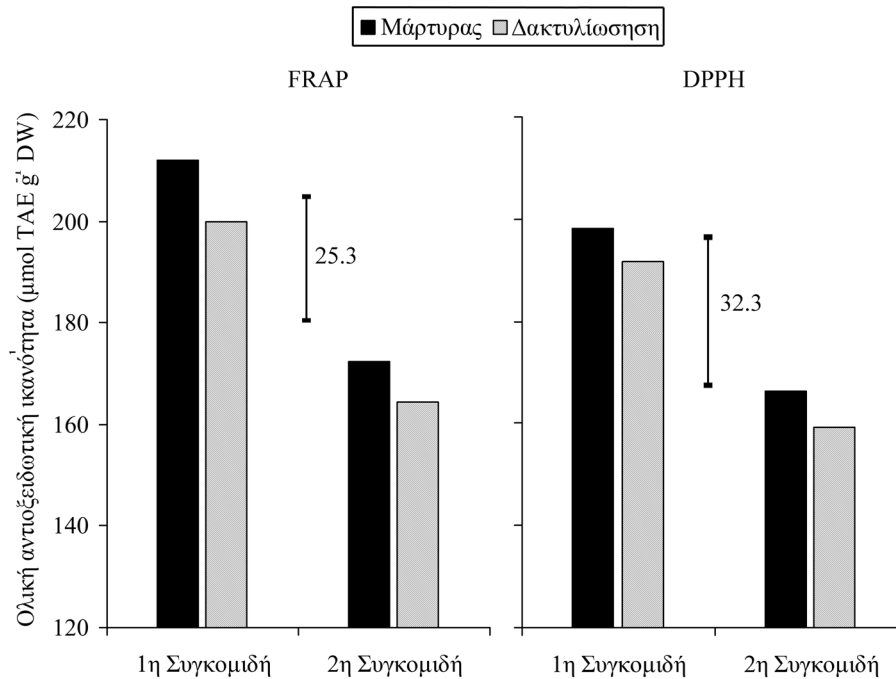
Πηγή	TP	FRAP	DPPH
Παραλλακτικότητας			
$Ph$	***	***	**
$Ptr$	NS	NS	NS
$Ph \times tr$	NS	NS	NS

NS μη σημαντικό, \*\* σημαντικό  $P < 0,01$  \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

Κατά την πρώτη συγκομιδή, η TAC ήταν ~200-212  $\mu\text{mol TAE g}^{-1}$  DW εκτιμούμενη με τη μέθοδο FRAP και 159-166  $\mu\text{mol TAE g}^{-1}$  DW εκτιμούμενη με την μέθοδο DPPH (Γράφημα 4.3). Οι επιδράσεις της συγκομιδής και της επέμβασης επί της TAC ήταν παρόμοιες με τις επιδράσεις επί των TP, οδηγώντας σε μειωμένη TAC στην όψιμη συγκομιδή και παρόμοια TAC μεταξύ των επεμβάσεων (Γράφημα 4.3, Πίνακας 4.3).



**Γράφημα 4. 2.** Ολικά φαινολικά (TP) των σπερμάτων καρδιάς ποικιλίας Franquette συγκομισμένων σε δύο χρόνους από κλάδους που είχαν δεχτεί επέμβαση ή όχι με δακτυλίωση. Η κάθετη μπάρα αντιστοιχεί στην τιμή HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$  από δι-παραγοντική ANOVA.



**Γράφημα 4. 3.** Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), εκτιμώμενη με τις μεθόδους FRAP και DPPH, των σπερμάτων καρυδιάς ποικιλίας Franquette συγκομισμένων σε δύο χρόνους από κλάδους που είχαν δεχτεί επέμβαση ή όχι με δακτυλίωση. Οι κάθετες μπάρες αντιστοιχούν στις τιμές HSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$  από δι-παραγοντική ANOVA.

#### 4.3.4. Διαλυτά σάκχαρα (SS) σπέρματος

Κατά την 1<sup>η</sup> συγκομιδή η σακχαρόζη ήταν το σάκχαρο με την υψηλότερη συγκέντρωση στα σπέρματα (~8-9 mg g<sup>-1</sup> DW), ακολουθούμενη από τη φρουκτόζη (~5 mg g<sup>-1</sup> DW), ενώ η γλυκόζη είχε τη μικρότερη συγκέντρωση (~1 mg g<sup>-1</sup> DW) (Πίνακας 4.4). Η περιεκτικότητα των σπερμάτων σε διαλυτά σάκχαρα επηρεάστηκε σημαντικά από το χρόνο συγκομιδής, καθώς κατά

**Πίνακας 4. 4.** Διαλυτά σάκχαρα (SS) των σπερμάτων καρυδιών της ποικιλίας Franquette σε δύο συγκομιδές υπό την επίδραση επέμβασης δακτυλίωσης.

Συγκομιδή	Επέμβαση	SS (mg g <sup>-1</sup> DW)		
		Γλυκόζη	Φρουκτόζη	Σακχαρόζη
1η	Μάρτυρας	1,14 <sup>a†</sup>	5,26 <sup>a</sup>	8,60 <sup>a</sup>
	Δακτυλίωση	1,08 <sup>a</sup>	5,12 <sup>a</sup>	8,38 <sup>a</sup>
2η	Μάρτυρας	0,74 <sup>b</sup>	3,04 <sup>b</sup>	4,77 <sup>b</sup>
	Δακτυλίωση	0,69 <sup>b</sup>	3,58 <sup>b</sup>	5,05 <sup>b</sup>
<i>Ph</i> <sup>††</sup>		***	***	***
<i>Ptr</i>		NS	NS	NS
<i>Ph × tr</i>		NS	NS	NS

† Οι μέσοι της κάθε μεταβλητής ακολουθούμενοι από το ίδιο πεζό γράμμα εντός της στήλης, δεν διαφέρουν σημαντικά με βάση τη δι-παραγοντική ANOVA.

†† Πιθανότητα της επίδρασης της συγκομιδής (*Ph*), της επέμβασης (*Ptr*) και της αλληλεπίδρασής τους (*Ph × tr*).

NS μη σημαντικό, \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

τη 2<sup>η</sup> συγκομιδή οι συγκεντρώσεις και των τριών σακχάρων βρέθηκαν μειωμένες. Αντίθετα η επέμβαση της δακτυλίωσης δεν επηρέασε σημαντικά τα διαλυτά σάκχαρα στα σπέρματα.

### 4.3.5. Χαρακτηριστικά καρυδέλαιου

#### 4.3.5.1. Ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) και βαθμός υπεροξειδίων (PV)

Στο καρυδέλαιο όλων των δειγμάτων βρέθηκαν χαμηλά επίπεδα FFA και PV, τα οποία ήταν 0,024-0,028 % OL και 0,051-0,058 meq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>, αντίστοιχα (Πίνακας 4.5). Ο χρόνος συγκομιδής και η επέμβαση δεν επηρέασαν καμία από τις δυο παραπάνω παραμέτρους.

#### 4.3.5.2. Προφίλ λιπαρών οξέων (FA)

Στο καρυδέλαιο των σπερμάτων της ποικιλίας

Franquette προσδιορίστηκαν τα λιπαρά οξέα μυριστικό (MY), παλμιτικό (PA), παλμιτελαϊκό (PO), στεαρικό (ST), ελαϊκό (OL), βαχενικό (VA), λινελαϊκό (LL), λινολενικό (LN), αραχιδικό (AR) και γονδοϊκό (GO) (Πίνακες 4.6 και 4.7).

Τα κύρια FA ποσοτικά ήταν τα PA, ST, OL, LL, και LN, και στους μάρτυρες της πρώτης συγκομιδής η ποσοστιαία τους περιεκτικότητα ήταν ~10%, ~3% ~18%, ~50% και 15%, αντίστοιχα. Ο χρόνος συγκομιδής επηρέασε την περιεκτικότητα του καρυδέλαιου σε PA και LL, αλλά όχι σε ST, OL και LN (Πίνακας 4.6). Συγκεκριμένα, κατά την δεύτερη συγκομιδή, το PA βρέθηκε μειωμένο και το LL αυξημένο σε σχέση με την πρώτη συγκομιδή. Η επέμβαση δεν είχε επίδραση επί της περιεκτικότητας των σπερμάτων σε κανένα από τα κύρια FA (Πίνακας 4.6).

**Πίνακας 4. 5.** Ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) και βαθμός υπεροξειδίων (PV) του καρυδέλαιου της ποικιλίας Franquette σε δύο συγκομιδές υπό την επίδραση επέμβασης δακτυλίωσης.

Συγκομιδή	Επέμβαση	FFA (% OL)	PV (meq O <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> )
1η	Μάρτυρας	0,026 <sup>a†</sup>	0,051 <sup>a</sup>
	Δακτυλίωση	0,024 <sup>a</sup>	0,053 <sup>a</sup>
2η	Μάρτυρας	0,028 <sup>a</sup>	0,058 <sup>a</sup>
	Δακτυλίωση	0,026 <sup>a</sup>	0,054 <sup>a</sup>
<i>Ph</i> <sup>††</sup>		NS	NS
<i>Ptr</i>		NS	NS
<i>Ph × tr</i>		NS	NS

† Οι μέσοι της κάθε μεταβλητής ακολουθούμενοι από το ίδιο πεζό γράμμα εντός της στήλης, δεν διαφέρουν σημαντικά με βάση τη δι-παραγοντική ANOVA.

†† Πιθανότητα της επίδρασης της συγκομιδής (*Ph*), της επέμβασης (*Ptr*) και της αλληλεπίδρασής τους (*Ph × tr*). NS μη σημαντικό.

**Πίνακας 4. 6.** Ποσοτικά προέχοντα λιπαρά οξέα (FA) του καρυδέλαιου της ποικιλίας Franquette σε δύο συγκομιδές υπό την επίδραση επέμβασης δακτυλίωσης.

Συγκομιδή	Επέμβαση	FA (%)				
		PA <sup>†</sup>	ST	OL	LL	LN
		C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1 n-9</sub>	C <sub>18:2 n-9,12</sub>	C <sub>18:3 n-9,12,15</sub>
1η	Μάρτυρας	10,41 <sup>a††</sup>	3,31 <sup>a</sup>	18,36 <sup>a</sup>	49,52 <sup>b</sup>	14,50 <sup>a</sup>
	Δακτυλίωση	9,75 <sup>a</sup>	3,21 <sup>a</sup>	18,72 <sup>a</sup>	49,33 <sup>b</sup>	14,64 <sup>a</sup>
2η	Μάρτυρας	8,08 <sup>b</sup>	3,15 <sup>a</sup>	18,97 <sup>a</sup>	50,57 <sup>ab</sup>	15,18 <sup>a</sup>
	Δακτυλίωση	8,01 <sup>b</sup>	3,14 <sup>a</sup>	18,66 <sup>a</sup>	52,32 <sup>a</sup>	14,89 <sup>a</sup>
<i>Ph</i> <sup>†††</sup>		***	NS	NS	**	NS
<i>Ptr</i>		NS	NS	NS	NS	NS
<i>Ph</i> × <i>tr</i>		NS	NS	NS	NS	NS

† PA: παλμιτικό οξύ, ST: στεαρικό οξύ, OL: ελαϊκό οξύ, LN: λινελαϊκό οξύ, LL: λινολενικό οξύ.

†† Οι μέσοι της κάθε μεταβλητής ακολουθούν από το ίδιο πεζό γράμμα εντός της στήλης, δεν διαφέρουν σημαντικά με βάση τη δι-παραγοντική ANOVA.

††† Πιθανότητα της επίδρασης της συγκομιδής (*Ph*), της επέμβασης (*Ptr*) και της αλληλεπίδρασής τους (*Ph* × *tr*). NS μη σημαντικό, \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

Στο καρυδέλαιο, βρέθηκαν σε μικρά ποσοστά τα οξέα MY, PO, VA, AR και GO (Πίνακας 4.7). Η ποσοστιαία περιεκτικότητα του καρυδέλαιου σε αυτά τα FA δεν ξεπέρασε το 1,5% συνολικά, με το χρόνο συγκομιδής και την επέμβαση της δακτυλίωσης να μην έχουν καμιά επίδραση επί των ποσοτήτων τους (Πίνακας 4.7).

Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα (UFA) αποτελούσαν το κύριο κλάσμα FA (~84-88%) του καρυδέλαιου, από τα οποία την μεγαλύτερη ποσοστιαία αναλογία είχαν τα πολύ-ακόρεστα (PUFA) σε ποσοστό ~64-67% και δευτερευόντως τα μονο-ακόρεστα (MUFA) σε ποσοστό ~20-21% (Πίνακας 4.8). Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA) είχαν ποσοτικά τη μικρότερη συνεισφορά (~11-14%) στο καρυδέλαιο (Πίνακας 4.8). Η επέμβαση της δακτυλίωσης δεν επηρέασε κανένα κλάσμα των FA, ενώ ο χρόνος συγκομιδής είχε σημαντική επίδραση μόνο επί των SFA, UFA και PUFA. Συγκεκριμένα όσο προχωρούσε η ωρίμανση παρατηρήθηκε μείωση των SFA και αυξήσεις των UFA και PUFA στο καρυδέλαιο (Πίνακας 4.8).

**Πίνακας 4. 7.** Ποσοτικά δευτερεύοντα λιπαρά οξέα (FA) του καρυδέλαιου της ποικιλίας Franquette σε δύο συγκομιδές υπό την επίδραση επέμβασης δακτυλίωσης.

Συγκομιδή	Επέμβαση	FA (%)				
		MY <sup>†</sup>	PO	VA	AR	GO
		C <sub>14:0</sub>	C <sub>16:1 n-9</sub>	C <sub>18:1 n-11</sub>	C <sub>20:0</sub>	C <sub>20:1 n-11</sub>
1η	Μάρτυρας	0,068 <sup>a††</sup>	0,171 <sup>a</sup>	1,33 <sup>a</sup>	0,127 <sup>a</sup>	0,234 <sup>a</sup>
	Δακτυλίωση	0,071 <sup>a</sup>	0,136 <sup>a</sup>	1,32 <sup>a</sup>	0,123 <sup>a</sup>	0,238 <sup>a</sup>
2η	Μάρτυρας	0,070 <sup>a</sup>	0,134 <sup>a</sup>	1,37 <sup>a</sup>	0,159 <sup>a</sup>	0,276 <sup>a</sup>
	Δακτυλίωση	0,075 <sup>a</sup>	0,139 <sup>a</sup>	1,44 <sup>a</sup>	0,139 <sup>a</sup>	0,272 <sup>a</sup>
<i>Ph</i> <sup>††</sup>		NS	NS	NS	NS	NS
<i>Ptr</i>		NS	NS	NS	NS	NS
<i>Ph</i> × <i>tr</i>		NS	NS	NS	NS	NS

† MY: μυριστικό οξύ, PO: παλμιτελαϊκό οξύ, VA: βαχενικό οξύ, AR: αραχιδικό οξύ, GO: γονδοϊκό οξύ.  
 †† Οι μέσοι της κάθε μεταβλητής ακολουθούν από το ίδιο πεζό γράμμα εντός της στήλης, δεν διαφέρουν σημαντικά με βάση τη δι-παραγοντική ANOVA.  
 ††† Πιθανότητα της επίδρασης της συγκομιδής (*Ph*), της επέμβασης (*Ptr*) και της αλληλεπίδρασής τους (*Ph* × *tr*). NS μη σημαντικό.

**Πίνακας 4. 8.** Κλάσματα λιπαρών οξέων (FA) του καρυδέλαιου της ποικιλίας Franquette σε δύο συγκομιδές υπό την επίδραση επέμβασης δακτυλίωσης.

Συγκομιδή	Επέμβαση	FA (%)				
		SF <sup>†</sup>	UFA	MUFA	PUFA	TFA
1η	Μάρτυρας	13,91 <sup>a††</sup>	84,13 <sup>b</sup>	20,10 <sup>a</sup>	64,03 <sup>b</sup>	98,04 <sup>a</sup>
	Δακτυλίωση	13,16 <sup>a</sup>	84,39 <sup>b</sup>	20,42 <sup>a</sup>	63,97 <sup>b</sup>	97,55 <sup>a</sup>
2η	Μάρτυρας	11,46 <sup>b</sup>	86,50 <sup>ab</sup>	20,75 <sup>a</sup>	65,75 <sup>ab</sup>	97,96 <sup>a</sup>
	Δακτυλίωση	11,37 <sup>b</sup>	87,74 <sup>a</sup>	20,52 <sup>a</sup>	67,21 <sup>a</sup>	99,10 <sup>a</sup>
<i>Ph</i> <sup>†††</sup>		***	**	NS	***	NS
<i>Ptr</i>		NS	NS	NS	NS	NS
<i>Ph</i> × <i>tr</i>		NS	NS	NS	NS	NS

† SFA: κορεσμένα, UFA: ακόρεστα, MUFA: μόνο-ακόρεστα, PUFA: πολύ-ακόρεστα, TFA: ολικά.  
 †† Οι μέσοι της κάθε μεταβλητής ακολουθούν από το ίδιο πεζό γράμμα εντός της στήλης, δεν διαφέρουν σημαντικά με βάση τη δι-παραγοντική ANOVA.  
 ††† Πιθανότητα της επίδρασης της συγκομιδής (*Ph*), της επέμβασης (*Ptr*) και της αλληλεπίδρασής τους (*Ph* × *tr*). NS μη σημαντικό, \*\* σημαντικό  $P < 0,01$ , \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .

### 3.3.6. Ρυθμός αφομοίωσης CO<sub>2</sub> (A<sub>CO2</sub>) και διαλυτά σάκχαρα (SS) φύλλων

Κατά την 1η δειγματοληψία τα επίπεδα A<sub>CO2</sub> των φύλλων ήταν ~16-18 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, ενώ με την πάροδο του χρόνου (2η δειγματοληψία) παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του A<sub>CO2</sub> σε επίπεδα ~5-6 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Πίνακας 4.9). Η επέμβαση της δακτυλίωσης δεν είχε

επίδραση επί του  $A_{CO_2}$  με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μαρτύρων και των φύλλων επί των βλαστών που είχαν δεχτεί δακτυλίωση (Πίνακας 4.9).

Κατά την 1<sup>η</sup> δειγματοληψία η περιεκτικότητα των φύλλων σε γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη ήταν  $\sim 1 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ ,  $\sim 4\text{-}5 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$  και  $\sim 6 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ , αντίστοιχα (Πίνακας 4.9). Η περιεκτικότητα των φύλλων σε διαλυτά σάκχαρα επηρεάστηκε σημαντικά από το χρόνο συγκομιδής, ενώ η επέμβαση της δακτυλίωσης δεν επέδρασε σημαντικά επί αυτών. Συγκεκριμένα, και στα τρία σάκχαρα, οι συγκεντρώσεις τους βρέθηκαν μειωμένες κατά τη 2<sup>η</sup> δειγματοληψία, ενώ σε κάθε δειγματοληψία δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων.

**Πίνακας 4. 9.** Ρυθμός αφομοίωσης  $CO_2$  ( $A_{CO_2}$ ) και διαλυτά σάκχαρα (SS) φύλλων της ποικιλίας Franquette σε δύο δειγματοληψίες υπό την επίδραση επέμβασης δακτυλίωσης.

Δειγματοληψία	Επέμβαση	$A_{CO_2}$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	SS ( $\text{mg g}^{-1} \text{ DW}$ )		
			Γλυκόζη	Φρουκτόζη	Σακχαρόζη
1η	Μάρτυρας	17,59 <sup>a†</sup>	0,97 <sup>a</sup>	4,64 <sup>a</sup>	6,17 <sup>a</sup>
	Δακτυλίωση	16,35 <sup>a</sup>	0,94 <sup>a</sup>	4,19 <sup>a</sup>	5,95 <sup>a</sup>
2η	Μάρτυρας	5,75 <sup>b</sup>	0,46 <sup>b</sup>	2,07 <sup>b</sup>	2,73 <sup>b</sup>
	Δακτυλίωση	5,16 <sup>b</sup>	0,30 <sup>b</sup>	1,92 <sup>b</sup>	2,51 <sup>b</sup>
<i>Ph</i> <sup>††</sup>		***	***	***	***
<i>Ptr</i>		NS	NS	NS	NS
<i>Ph</i> × <i>tr</i>		NS	NS	NS	NS

† Οι μέσοι της κάθε μεταβλητής ακολουθούμενοι από το ίδιο πεζό γράμμα εντός της στήλης, δεν διαφέρουν σημαντικά με βάση την δι-παραγοντική ANOVA.

†† Πιθανότητα της επίδρασης της συγκομιδής (*Ph*), της επέμβασης (*Ptr*) και της αλληλεπίδρασής τους (*Ph* × *tr*).

NS μη σημαντικό, \*\*\* σημαντικό  $P < 0,001$ .



## 4.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

### 4.4.1. Ποσοστό ωριμότητας καρπών, καρπολογικά χαρακτηριστικά

Κατά την πρώτη συγκομιδή όλοι οι καρποί είχαν άρτιο περικάρπιο υποδεικνύοντας ότι κανένα μέρος του φορτίου δεν ήταν σε κατάλληλο στάδιο για συγκομιδή. Αντίθετα, κατά τη δεύτερη συγκομιδή το ποσοστό των καρπών στους οποίους δεν είχε σχιστεί το περικάρπιο ήταν μικρότερο του 20%, ποσοστό που είναι ικανοποιητικό για τη συγκομιδή (Kader and Thompson, 2002; Ποντίκης, 2000). Η δακτυλίωση επέδρασε θετικά οδηγώντας σε προώθηση της ωρίμανσης των καρπών (μεγαλύτερο ποσοστό καρπών με σχισμένο περικάρπιο 50-100%), ενώ παράλληλα οδήγησε σε μεγαλύτερη ομοιομορφία του σταδίου ωριμότητας των καρπών (μικρότερο ποσοστό καρπών με άρτιο περικάρπιο).

Όσον αφορά τα καρπολογικά χαρακτηριστικά κατά την ανάπτυξη-ωρίμανση του καρπού, παρατηρήθηκε αύξηση του βάρους και της ελαιοπεριεκτικότητας στο σπέρμα με την πάροδο του χρόνου, με ταυτόχρονη μείωση της υγρασίας του, φαινόμενα που είναι χαρακτηριστικά κατά την ωρίμανση των καρπών της καρυδιάς (Li et al., 2012; Pinney et al., 1998). Η δακτυλίωση δεν επηρέασε το βάρος του ΟΕ (σπέρμα με κέλυφος) γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στο χρόνο εφαρμογής της επέμβασης, ο οποίος συνέπεσε με την περίοδο που η αύξηση ολόκληρου του καρπού και του ξυλοποιημένου ενδοκαρπίου (κέλυφος) έχει ολοκληρωθεί και ξεκινά η αύξηση του σπέρματος (Pinney et al., 1998; Ποντίκης, 2000). Αντίθετα, η δακτυλίωση οδήγησε σε αυξημένο βάρος και ελαιοπεριεκτικότητα του σπέρματος που πιθανόν προήλθε μέσω της προώθησης της ωρίμανσης ή/και της συσσώρευσης ουσιών που συντίθενται στα φύλλα πάνω από το σημείο της τομής. Όσον αφορά την επίδραση της δακτυλίωσης επί της καρυδιάς δεν υπάρχουν δεδομένα στη βιβλιογραφία. Σε άλλα δενδρώδη είδη όπως το αβοκάντο έχει βρεθεί αύξηση του βάρους των καρπών 8 εβδομάδες μετά την εφαρμογή δακτυλίωσης (Davie et al., 1995).

### 4.4.2. Ποιοτικά χαρακτηριστικά σπερμάτων με βάση την αντίληψη του καταναλωτή

Οι τιμές των παραμέτρων του χρώματος που καταγράφηκαν και στις δύο συγκομιδές αντιστοιχούν σε εξαιρετικά ανοιχτόχρωμο χρωματισμό των σπερμάτων με εξαιρετική εμφάνιση. Στην όψιμη συγκομιδή οι μειωμένες τιμές των  $L^*$ ,  $h^o$  και οι αυξημένες τιμές του  $C^*$  σε σχέση με τα σπέρματα της πρώτης συγκομιδής οφειλόταν στο γεγονός ότι καθώς προχωρά η ωρίμανση των καρυδιών τα σπέρματα αποκτούν κιτρινωπό χρωματισμό (Kader and Thompson, 2002; Pinney et al., 1998). Ένα μέρος της εμφάνισης του κίτρινου χρωματισμού κατά την ωρίμανση των καρυδιών μπορεί να οφείλεται εν μέρει στην αύξηση της ελαιοπεριεκτικότητας, καθώς αναφέρεται ότι το καρυδέλαιο μπορεί να συνεισφέρει στον κίτρινο χρωματισμό του σπέρματος (Crowe and White, 2003). Η δακτυλίωση επηρέασε μόνο

την παράμετρο  $L^*$  οδηγώντας σε ελαφρώς μειωμένες τιμές, προφανώς μέσω της προώθησης της ωρίμανσης που παρατηρήθηκε με την εφαρμογή της επέμβασης. Ωστόσο, σε όλες τις περιπτώσεις το  $L^*$  ήταν εξαιρετικά υψηλότερο από την τιμή 40 η οποία διασφαλίζει καλή ποιότητα σύμφωνα με τα πρότυπα της βιομηχανίας καρυδιών (Wang et al., 2007), αλλά και το άθροισμα των τιμών των  $L^*$ ,  $h^o$  και  $C^*$  μεγαλύτερο της τιμής 155, που αντιστοιχεί σε ανοιχτόχρωμα σπέρματα (light kernels) καλής ποιότητας (Warmund et al., 2009). Βέβαια τα παραπάνω όρια αναφέρονται για τα αποξηραμένα σπέρματα χωρίς να υπάρχουν αντίστοιχα δεδομένα για τα νωπά, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση.

Σε όλα τα δείγματα, οι τιμές των FFA και PV ήταν εξαιρετικά χαμηλές ( $< 0,028\%$  και  $< 0,058 \text{ meq O}_2 \text{ kg}^{-1}$ , αντίστοιχα). Στην βιβλιογραφία υπάρχουν πολλά δεδομένα όσον αφορά τα FFA και PV του καρυδέλαιου στα αποξηραμένα σπέρματα, με μεγάλες διακυμάνσεις στις τιμές τους, όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 2. Δεν υπάρχουν στοιχεία στη βιβλιογραφία για τα FFA και PV του καρυδέλαιου των νωπών καρυδιών και με βάση τα δεδομένα για τα αποξηραμένα οι παρούσες τιμές βρίσκονται στα κατώτερα όρια. Επίσης, οι τιμές των FFA και PV που βρέθηκαν αντιστοιχούν σε καρυδέλαιο εξαιρετικής ποιότητας δεδομένου ότι, σύμφωνα με την αντίληψη του καταναλωτή, τα FFA και PV αντιπροσωπεύουν το τάγγισμα (υδρολυτικό και οξειδωτικό, αντίστοιχα) (Robards et al., 1988), ενώ τόσο ο χρόνος συγκομιδής όσο και η δακτυλίωση δεν είχαν κάποια επίδραση επί των FFA και του PV.

#### **4.4.3. Ποιοτικά χαρακτηριστικά σπερμάτων με βάση τη θρεπτική αξία**

Σε όλα τα δείγματα (συγκομιδές και επεμβάσεις), οι τιμές των TP, TAC (εκτιμώμενη με τις μεθόδους FRAP και DPPH) ήταν στα ανώτερα όρια των τιμών αναφέρονται στη βιβλιογραφία για τα ξερά καρύδια (Πίνακας 2.2 Κεφάλαιο 2) και σε γενική συμφωνία με τις τιμές που βρέθηκαν από τα πειράματα που περιγράφονται στα Κεφάλαια 2 και 3. Παράλληλα, τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών που βρέθηκαν αντιστοιχούν σε εξαιρετική θρεπτική αξία των σπερμάτων συγκρινόμενα με διάφορα είδη φυτικών προϊόντων (Abe et al., 2010; Blomhoff et al., 2006; Halvorsen et al., 2002; Halvorsen et al., 2006; Kornsteiner et al., 2006; Yang et al., 2009). Τα ολικά αντιοξειδωτικά (TP, TAC, DPPH) παρουσίασαν πτωτική τάση μεταξύ 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> συγκομιδής, ενώ η δακτυλίωση δεν είχε επίδραση επί των επιπέδων τους. Στην ελιά έχει βρεθεί μείωση των φαινολικών κατά την ωρίμανση (Gutiérrez et al., 1998), ενώ για τα νωπά καρύδια αναφέρεται ότι η μείωση της στιφής γεύσης κατά την ωρίμανση οφείλεται στην μείωση των φαινολικών.

Η σύσταση του καρυδέλαιου που βρέθηκε είναι σε γενική συμφωνία με τη σύσταση που έχει βρεθεί και σε άλλες έρευνες καρυδιών (Amaral et al., 2003; Dogan and Akgul, 2005; Gan et al., 2005; Kris-Etherton et al., 2000; Li et al., 2007; López et al., 1995; Martinez et al., 2010; Pereira et al., 2008), καθώς και με τη σύσταση που αναφέρεται στο Κεφάλαιο 2. Τα

υψηλά επίπεδα UFA, PUFA, LL ( $\omega$ -6), LN ( $\omega$ -3) που βρέθηκαν προσδίδουν εξαιρετική διαιτητική αξία στα σπέρματα. Η δακτυλίωση δεν παρουσίασε επίδραση επί κανενός FA ή κλάσματος αυτών. Από την άλλη, η δεύτερη συγκομιδή σε εμπορικά κατάλληλη ωριμότητα καρπού, οδήγησε σε μειωμένα επίπεδα PA, SFA και αυξημένα επίπεδα LL, UFA και PUFA, δεδομένα που δείχνουν υπεροχή των καρπών της 2<sup>ης</sup> συγκομιδής έναντι αυτών της 1<sup>ης</sup> όσον αφορά τη σύσταση του καρυδέλαιου. Παρόμοια αύξηση του ποσοστού των PUFA και μείωση του ποσοστού των SFA κατά την ωρίμανση έχει παρατηρηθεί και σε άλλη μελέτη (Greve et al., 1992). Η αύξηση των UFA σε συνδυασμό με τη μείωση των SFA κατά την ωρίμανση των ελαιωδών καρπών έχει αναφερθεί και σε άλλα είδη. Στην ελιά αναφέρεται τάση μείωσης του PA με παράλληλη αύξηση του LL κατά την ωρίμανση (Barone et al., 1994; Gutiérrez et al., 1998; Freihat et al., 2008).

#### **4.4.4. Ρυθμός αφομοίωσης CO<sub>2</sub> φύλλων (A<sub>CO2</sub>) και διαλυτά σάκχαρα (SS) φύλλων και σπερμάτων**

Τα επίπεδα του A<sub>CO2</sub> που βρέθηκαν και στις δυο δειγματοληψίες ήταν σε γενική συμφωνία με το εύρος (~3-13  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) που έχει αναφερθεί για την καρυδιά (Liu et al., 2010; Tombesi et al., 1983). Οι μειωμένες τιμές του A<sub>CO2</sub> που παρατηρήθηκαν στην 2<sup>η</sup> δειγματοληψία σε σχέση με την πρώτη ήταν αποτέλεσμα της μεγαλύτερης ηλικίας των φύλλων ή/και των κλιματικών συνθηκών. Κατά την 1<sup>η</sup> δειγματοληψία (28/8/2009) τα φύλλα ήταν πλήρως αναπτυγμένα και η θερμοκρασία ήταν ~25° C, ενώ κατά την 2<sup>η</sup> ημερομηνία (7/10/2009) πλησίαζε το στάδιο πτώσης των φύλλων και η θερμοκρασία ήταν ~18° C. Για την ποικιλία Seir έχει βρεθεί ότι τα υψηλότερα επίπεδα A<sub>CO2</sub> παρατηρούνται σε θερμοκρασίες ~20-25° C (Tombesi et al., 1983), ενώ σύμφωνα με τους Frak et al. (2001), σε υβρίδιο *J. nigra* × *regia* η φωτοσυνθετική ικανότητα του φύλλου μειώνεται κατά το γηρασμό του, όπως και αναμένεται. Έχει αναφερθεί ότι η δακτυλίωση μπορεί να προκαλέσει πρόωρη πτώση των φύλλων (γηρασμό) και χλωρωτικά φαινόμενα σε διάφορα είδη (Schneider, 1954; Ticho, 1971), ενώ παράλληλα να μειώσει τον A<sub>CO2</sub> (Marquard, 1987). Στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκαν διαφορές στον A<sub>CO2</sub> μεταξύ των φύλλων του μάρτυρα και της δακτυλίωσης καθώς η μέτρηση έγινε σε φύλλα που μακροσκοπικά ήταν στο ίδιο στάδιο. Θα πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι κατά το χρόνο της 2<sup>ης</sup> ημερομηνίας στους κλάδους που είχαν υποστεί δακτυλίωση παρατηρήθηκε μακροσκοπικά μεγαλύτερο ποσοστό γηρασμένων φύλλων σε σχέση με το μάρτυρα.

Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε μείωση των SS (γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη) με την πάροδο του χρόνου όπως έχει βρεθεί και σε άλλες μελέτες (Drossopoulos et al., 1996), ενώ η δακτυλίωση δεν επηρέασε την περιεκτικότητα των φύλλων σε SS. Σε φύλλα μανταρινιάς αναφέρεται παρόμοια η μείωση των SS γλυκόζης, φρουκτόζης,

σακχαρόζης κατά την πρόοδο της βλαστικής περιόδου χωρίς να παρατηρείται επίδραση της δακτυλίωσης επί των συγκεντρώσεων τους (Iglesias et al., 2002). Στη ροδακινιά, επίσης, η δακτυλίωση δεν είχε επίδραση επί των SS των φύλλων (Jordan and Habib, 1996). Οι Rivas et al. (2007), αναφέρουν αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στα φύλλα μανταρινιάς υπό την επίδραση δακτυλίωσης χωρίς η επέμβαση να επιδρά επί της φρουκτόζης και της σακχαρόζης.

Στα σπέρματα, η φθίνουσα σειρά των SS ήταν σακχαρόζη > φρουκτόζη > γλυκόζη, ενώ οι συγκεντρώσεις και των τριών σακχάρων παρουσίασαν πτωτική τάση κατά την ωρίμανση. Τα δεδομένα που αφορούν την βιοσύνθεση και διακίνηση των προϊόντων του πρωτογενούς μεταβολισμού στους καρπούς της καρυδιάς είναι περιορισμένα. Οι Li et al. (2012), αναφέρουν τη γλυκόζη, τη φρουκτόζη και τη σακχαρόζη ως τα κύρια SS στο σπέρμα της καρυδιάς, των οποίων οι συγκεντρώσεις βρέθηκαν να έχουν πτωτική τάση κατά την ωρίμανση. Οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν ότι κατά τα τελευταία στάδια ανάπτυξης των σπερμάτων η σακχαρόζη είναι το κύριο SS ακολουθούμενη από τη φρουκτόζη, ενώ η γλυκόζη βρίσκεται στη μικρότερη συγκέντρωση. Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε επίδραση της δακτυλίωσης επί της περιεκτικότητας των σπερμάτων σε SS. Η έλλειψη επίδρασης της δακτυλίωσης πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι στην καρυδιά η αυξημένη διαθεσιμότητα των προϊόντων του πρωτογενούς μεταβολισμού πάνω από την τομή οδηγεί σε συσσώρευση άλλων συστατικών και όχι των ίδιων των SS. Πράγματι, όπως βρέθηκε στην παρούσα μελέτη η δακτυλίωση οδήγησε σε αυξημένο βάρος σπέρματος και αυξημένη ελαιοπεριεκτικότητα. Τα σάκχαρα στους φυτικούς ιστούς χρησιμοποιούνται για τη μετέπειτα σύνθεση άλλων συστατικών και ειδικά στην περίπτωση των ελαιωδών καρπών μεγάλο μέρος των σακχάρων συμμετέχουν στη σύνθεση αποθησαυριστικών λιπιδίων (Goodwin and Mercer, 1983). Η κινητοποίηση των λιπιδίων και η επικείμενη γλυκο-νεογένεση αποτελεί την κύρια πηγή κάλυψης των απαιτήσεων ορισμένων σπόρων σε άνθρακα και ενέργεια κατά τη βλάστησή τους (Cooper and Beevers, 1969), φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί και στην καρυδιά (Nezamdoost et al., 2009).

#### **4.4.5. Συμπεράσματα**

Η δακτυλίωση αποτελεί μια επέμβαση που έχει εφαρμοστεί και μελετηθεί σε πολλά δενδρώδη είδη, αλλά δεν υπάρχουν στοιχεία για την καρυδιά. Στην παρούσα μελέτη, η επέμβαση της δακτυλίωσης σε κλάδους καρυδιάς στο στάδιο έναρξης της αύξησης του σπέρματος βρέθηκε να επιδρά θετικά επί ορισμένων χαρακτηριστικών των καρπών. Συγκριμένα, οδηγεί σε πρωίμηση και μεγαλύτερη ομοιομορφία της ωρίμανσης του φορτίου με αυξημένο βάρος σπέρματος και αυξημένη ελαιοπεριεκτικότητα. Ωστόσο, εάν συνυπολογιστούν οι αυξήσεις του βάρους, του ξηρού βάρους και της ελαιοπεριεκτικότητας

των σπερμάτων μπορεί να θεωρηθεί ότι οι καρποί που προέρχονται από κλάδους που έχουν υποστεί δακτυλίωση περιέχουν ποσοτικά υψηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικών και ουσιωδών λιπαρών οξέων (PUFA, LL, LN). Παράλληλα, δεν προκαλεί υποβάθμιση της ποιότητας του προϊόντος τόσο με βάση την οπτική και γευστική αντίληψη του καταναλωτή (χρώμα σπέρματος, FFA, PV), όσο και με βάση την θρεπτική αξία (TP, TAC, σύσταση καρυδέλαιου σε FA).

Η πρωίμηση της παραγωγής είναι σημαντική για την περίπτωση των νωπών καρυδιών, δεδομένου του μικρού χρονικού διαστήματος που είναι διαθέσιμο το προϊόν αυτό στην αγορά. Η εφαρμογή της δακτυλίωσης μπορεί να έχει σημαντική πρακτική εφαρμογή κατά την παραγωγή διαφόρων προϊόντων της καρυδιάς. Η αύξηση της ομοιομορφίας του σταδίου ωριμότητας των καρπών είναι εξαιρετικά σημαντική για την περίπτωση των αποξηραμένων καρυδιών όπου θα πρέπει να συγκομίζονται στο βέλτιστο στάδιο, ώστε να εξασφαλίζεται η καλύτερη ποιότητά και ικανότητα για συντήρηση όπως τονίζεται από τους Kader and Thompson (2002). Τέλος, μέσω της δακτυλίωσης μπορεί να αυξηθεί η απόδοση της καλλιέργειας σε καρυδέλαιο, το οποίο αποτελεί ένα ακόμα σημαντικό προϊόν της καρυδιάς.

#### 4.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- Abe, L.T., Lajolo, F.M., Genovese, M.I.,** 2010. Comparison of phenol content and antioxidant capacity of nuts. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* **30**, 254-259.
- Amaral, J.S., Casal, S., Pereira, J.A., Seabra, R.M., Oliveira, B.P.P.,** 2003. Determination of sterol and fatty acid compositions, oxidative stability, and nutritional value of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars grown in Portugal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 7698-7702.
- Andersen, P.C., Brodbeck, B.V.,** 1988. Water relation and net CO<sub>2</sub> assimilation of peach leaves of different ages. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **113**, 242-248.
- Arranz, S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F.,** 2008. Antioxidant capacity of walnut (*Juglans regia* L.): contribution of oil and defatted matter. *European Food and Research Technology* **227**, 425-431.
- Barone, E., Gullo, G., Zappia, R., Inglese, P.,** 1994. Effect of crop load on fruit ripening and olive oil (*Olea europea* L.) quality. *Journal of Horticultural Science* **69**, 67-73.
- Blomhoff, R., Carlsen, M.H., Andersen, L.F., Jacobs Jr , D.R.,** 2006. Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. *British Journal of Nutrition* **96**, S52-S60.
- Cohen, A.,** 1984. Citrus fruit enlargement by beans of summer girdling. *Journal of Horticultural Science* **59**, 119-125.
- Cooper, T.G. and Beevers, H.** (1969) Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm. Enzyme constituents and catalytic capacity. *Journal of Biological Chemistry* **244**, 3507-3513.
- Crane, C.J., Nelson, M.M.,** 1972. Effects of crop load, girdling and auxin application on alternate bearing of the pistachio. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **97**, 337-339.
- Crowe, T., White, P.,** 2003. Oxidation, flavor, and texture of walnuts reduced in fat content by supercritical carbon dioxide. *Journal of the American Oil Chemist' Society* **80**, 569-574.
- Davie, S.J., Stassen, P.J.C., van der Walt, M., Snijder, B.,** 1995. Girdling avocado trees for improve production. *South African Avocado Grower's Yearbook* **18**, 51-53.
- Day, K.R., Dejong, T.M.,** 1990. Girdling of early season Mayfire necratine trees. *Journal of Horticultural Science* **65**, 529-534.
- Dennis, F.G.Jr., Edgerton, L.J.,** 1966. Effects of gibberellins and ringing on apple fruit development and flower bud formation. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **88**, 14-24.

- Dogan, M., Akgul, A.,** 2005. Fatty acid composition of some walnut (*Juglans regia* L. ) cultivars from east Anatolia. *Grasas y Aceites* **56**, 328-331.
- Drossopoulos, B., Kouchaji, G.G., Bouranis, D.L.,** 1996. Seasonal dynamics of mineral nutrients and carbohydrates by walnut tree leaves. *Journal of Plant Nutrition* **19**, 493-516.
- Evert, D.R., Smittle, D.A.,** 1990. Limb girdling influences rooting survival, total sugar and starch of dormant hardwood peach cuttings. *HortScience* **25**, 1224-1226.
- Ferree, D.C., Palmer, J.W.,** 1982. Effect of spur defoliation and ringing during bloom on fruiting, fruit mineral level, and net photosynthesis of golden delicious apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **107**, 1182-1186.
- Fischler, M., Goldschmidt, E.E., Monselise, S.P.,** 1983. Leaf area and fruit size on girdled grapefruit branches. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **108**, 218-221.
- Frak, E., Le Roux, X., Millard, P., Dreyer, E., Jaouen, G., Saint-Joanis, B., Wendler, R.,** 2001. Changes in total leaf nitrogen and partitioning of leaf nitrogen drive photosynthetic acclimation to light in fully developed walnut leaves. *Plant, Cell & Environment* **24**, 1279-1288.
- Freihat, N.M., Al-Shannag, A.K., El Assi, N.,** 2008. Qualitative responses of “Nabali” olive oil to harvesting time and altitudes at sub-humid Mediterranean. *International Journal of Food Properties* **11**, 561-570.
- Gan, H.L., Man, Y.B.C., Tan, C.P., NorAini, I., Nazimah, S.A.H.,** 2005. Characterisation of vegetable oils by surface acoustic wave sensing electronic nose. *Food Chemistry* **89**, 507-518.
- Goldschmidt, E.E., Golomb, A.,** 1982. The carbohydrate balance of alternate bearing citrus trees and significance of reserves for flowering and fruiting. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **107**, 206-208.
- Goodwin, T.W., Mercer, E.I.,** 1983. Introduction to plant biochemistry 2<sup>nd</sup> ed. *Pergamon Press, Oxford, UK* pp. 227-233, 309-315.
- Greve, C.L., McGranahan, G., Hasey, J., Snyder, R., Kelly, K., Goldhamer, D., Labacitch, J.M.,** 1992. Variation in polyunsaturated fatty acids composition of Persian walnut. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **117**, 518-522.
- Gutiérrez, F., Jiménez, B., Ruíz, A., Albi, M.A.,** 1998. Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties Picual and Hojiblanca and on the different components involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 121-127.

- Halvorsen, B.L., Carlsen, M.H., Phillips, K.M., Böhn, S.K., Holte, K., Jacobs Jr, D.R., Blomhoff, R.,** 2006. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *American Journal of Clinical Nutrition* **84**, 95-135.
- Halvorsen, B.L., Holte, K., Myhrstad, M.C.W., Barikmo, I., Hvattum, E., Remberg, S.F., Wold, A.-B., Haffner, K., Baugerød, H., Andersen, L.F., Moskaug, Û., Jacobs, D.R., Blomhoff, R.,** 2002. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *Journal of Nutrition* **132**, 461-471.
- Iglesias, D.J., Lliso, I., Tadeo, F.R., Talon, M.,** 2002. Regulation of photosynthesis through source: sink imbalance in *citrus* is mediated by carbohydrate content in leaves. *Physiologia Plantarum* **116**, 563-572.
- Jordan, M.-O., Habib, R.,** 1996. Mobilizable carbon reserves in young peach trees as evidenced by trunk girdling experiments. *Journal of Experimental Botany* **47**, 79-87.
- Kader, A.A., Thompson, J.E.,** 2002. Postharvest Handling Systems: Tree Nuts, In: A, Kader (ed.), Postharvest Technology of Horticultural Crops. *University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Oakland, USA*, pp. 399-406.
- Kornsteiner, M., Wagner, K.-H., Elmadfa, I.,** 2006. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chemistry* **98**, 381-387.
- Kramer, P.J., Kozlowski, T.T.,** 1979. Physiology of Woody Plants. *Academic Press, New York, USA*.
- Kris-Etherton, P., Taylor, D.S., Yu-Poth, S., Huth, P., Moriarty, K., Fishell, V., Hargrove, R.L., Zhao, G., Etherton, T.D.,** 2000. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *The American Journal of Clinical Nutrition* **71**, 179S-188S.
- Lahav, E., Geffen, B., Zamet, D.,** 1971a. The effect of girdling on the productivity of the avocado. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **96**, 396-398.
- Lahav, E., Geffen, B., Zamet, D.,** 1971b. The effect of girdling on fruit quality, phenology and mineral analysis of the avocado tree. *California Avocado Society Yearbook* **55**, 162-168.
- Lahav, E., Zamet, D., Gazit, S., Lavi, V.,** 1986. Girdling as a means of shortening the juvenile period of avocado seedlings. *HortScience* **21**, 1038-1039.
- Lavee, S., Haskal, A., Ben-Tal, Y.,** 1983. Girdling olive trees, a partial solution to biennial bearing. I. Methods, timing and direct tree response. *Journal of Horticultural Science* **58**, 209-218.
- Li, Tsao, R., Yang, R., Kramer, J.K.G., Hernandez, M.,** 2007. Fatty acid profiles, tocopherol contents, and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* var.



- cordiformis*) and persian walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 1164-1169.
- Li, Y., Ma, S., Wang, Y., Xuan, X., Hou, L., Sun, Q., Yang, K.,** 2012. The dynamics of fat, protein and sugar metabolism during walnut (*Juglans regia* L.) fruit development. *African Journal of Biotechnology* **11**, 1267-1276.
- Liu, W., Wang, H., Shi, Y., Gao, Y., Zhang, Z., Duan, H., Fang, J., He, F.,** 2010. The effect of different N, P, K rates on photosynthesis rate and chlorophyll content of leaves of walnut saplings. *Acta Horticulturae* **861**, 283-288.
- Loescher, W.H., McCamant, T., Keller, J.D.,** 1990. Carbohydrate reserves, translocation, and storage in woody plant roots. *HortScience* **25**, 274-281.
- López, A., Pique, M.T., Romero, A., Aleta, N.,** 1995. Influence of cold-storage conditions on the quality of unshelled walnuts. *International Journal of Refrigeration* **18**, 544-549.
- Martínez, M.L., Labuckas, D.O., Lamarque, A.L., Maestri, D.M.,** 2010. Walnut (*Juglans regia* L.): genetic resources, chemistry, by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**, 1959-1967.
- Marquard, R.D.,** 1986. Influence of leaf ratio on nut quality, shoot carbohydrates, and photosynthesis of pecan. *HortScience* **22**, 256-257.
- Menzel, C.M., Paxton, B.F.,** 1986. The effect of cincturing at different stages of vegetative flush maturity on the flowering of litchi (*Litchi chinensi* Sonn). *Journal of Horticultural Science* **61**, 135-139.
- Meyer, M.D., Terry, L.A.,** 2008. Development of a rapid method for the sequential extraction and subsequent quantification of fatty acids and sugars from avocado mesocarp tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 7439-7445.
- Monselesse, S.P., Goren, R., Wallerstein, I.,** 1972. Girdling effects on orange fruit set and young fruit abscission. *HortScience* **7**, 514-515.
- Nezamdoost, T., Tamaskani, F., Abdolzadeh, A., Sadeghipour, H.R.,** 2009. Lipid mobilization, gluconeogenesis and ageing-related processes in dormant walnut kernels during moist chilling and warm incubation. *Seed Science Research* **19**, 91-101.
- Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L.,** 2008. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology* **46**, 2103-2111.
- Pinney, K., Labavitch, J.M., Polito, V.S.,** 1998, Fruit growth and development, In: Ramos, D.E., (Ed.), Walnut Production Manual, *University of California Press, USA*, pp. 136-145.
- Ποντίκης, Κ.,** 2000. Ειδική Δενδροκομία, Τόμος Δεύτερος, Ακρόδρυα – Πυρηνόκαρπα – Λοιπά Καρποφόρα, *Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα-Πειραιας, Ελλάδα*, σελ. 130.

- Rivas, F., Gravina, A., Agustí, M.,** 2007. Girdling effects on fruit set and quantum yield efficiency of PSII in two *Citrus* cultivars. *Tree Physiology* **27**, 527-535.
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W.,** 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* **66**, 401-436.
- Schneider, H.,** 1954. Effect of trunk girdling on phloem of trunk of sweet orange trees on sour orange rootstocks. *Hilgardia* **22**, 593-601.
- Ticho, R.I.,** 1971. Girdling, a means to increase avocado fruit production. *California Avocado Society Yearbook* **54**, 90-94.
- Tombesi, A., DeJong, T.M., Ryugo, K.,** 1983. Net CO<sub>2</sub> assimilation characteristics of walnut leaves under field and laboratory conditions. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **108**, 558-561.
- Wallerstein, I., Goren, R., Monselise, S.P.,** 1974. The effect of girdling on starch accumulation in sour orange seedlings. *Canadian Journal of Botany* **52**, 935-937.
- Wang, S., Monzon, M., Johnson, J.A., Mitcham, E.J., Tang, J.,** 2007. Industrial-scale radio frequency treatments for insect control in walnuts II: Heating uniformity and energy efficiency. *Postharvest Biology and Technology* **45**, 240-246.
- Warmund, M.R., Elmore, J., Drake, M., Yates, M.D.,** 2009. Descriptive analysis of kernels of selected black and Persian walnut cultivars. *Journal of the Science of Food Agriculture* **89**, 117-121.
- Yang, J., Liu, R.H., Halim, L.,** 2009. Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds. *LWT - Food Science and Technology* **42**, 1-8.